

**Charakterisierung der Ca^{++} -ATPase und
Vergleich mit der alkalischen Phosphatase in
Mikrosomenfraktionen des Rattenherzens**

Hansgeorg Reiner

1976

Aus der Forschergruppe Diabetes und
der III. med. Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing
(Direktor: Prof. Dr. H. Mehnert)

Charakterisierung der Ca^{++} -ATPase und Vergleich mit
der alkalischen Phosphatase in Mikrosomenfraktionen
des Rattenherzens

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Hansgeorg Reiner
aus
Babenhausen/Schwaben

München 1976

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Do. Dr. K.D. Hepp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.Okt.1976



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Methodik	1
I. Präparationen	1
II. Proteinbestimmung	2
III. Verfahren zur Elektrophorese	3
IV. Pufferlösungen	3
V. Bestimmung der Enzymaktivitäten	10
1. Myklofen	11
2. Nucleotidhydrolyasen	12
3. Ca^{++} -ATPase	12
4. Ca^{++} -stimulierbare ATPase	12
5. p-ATPase: a) bei pH 7,4	12
b) bei pH 9,6 (AB)	12
VI. Nucleotidische Annotierung	17
1. Bestimmung von Ca^{++} -ATPase Aktivitäten	17
2. Kontrolle	18
III. Ergebnisse	
I. Vergleich der Fraktionen	19
1. Supernatant	19
2. Membranfraktion	20
II. Charakterisierung der mikrosomalen Ca^{++} -ATPase	20
1. Elektrophoretische Analyse	20
2. Substratspezifität	21
3. Aktivierungskinetik der mikrosomalen Ca^{++} -ATPase durch freie Calcium	21
4. Aktivierungsaffinität der mikrosomalen Ca^{++} -ATPase	22
III. Vergleich mit der mikrosomalen p-ATPase	
1. bei pH 7,4 in Tris-HCl-Puffer	23
2. Einfluss verschiedener Salze	24
3. Aktivierungskinetik durch Magnesium	25
4. Wirkung der Magnesiumaktivierung durch Calcium	25

Meinen Großeltern
Georg und Maria Reiner

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
A Einleitung	1
B Methodik	4
I. Präparation	4
II. Proteinbestimmung	8
III. Methodik zur Elektronenmikroskopie	9
IV. Phosphattest	9
V. Bestimmung der Enzymaktivitäten	10
1. Myokinase	10
2. Succinatdehydrogenase	11
3. $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$	12
4. Ca^{++} -stimulierbare ATPase	14
5. p-NPPase a) bei pH 7,4	15
b) bei pH 9,8 (AP)	16
VI. Mathematische Auswertung	17
1. Berechnung der spezifischen Aktivitäten	17
2. Statistik	18
C Ergebnisse	
I. Vergleich der Fraktionen	19
1. Enzymmuster	19
2. Morphologie	20
II. Charakterisierung der mikrosomalen $\text{Ca}^{++} - \text{ATPase}$	26
1. Substratabhängigkeit	26
2. Substratspezifität	27
3. Aktivierungskinetik der mikrosomalen $\text{Ca}^{++} - \text{ATPase}$ durch freies Calcium	28
4. Aktivatorspezifität der mikrosomalen $\text{Ca}^{++} - \text{ATPase}$	30
III. Vergleich mit der mikrosomalen p-NPPase	
1. bei pH 7,4 in Tris-HCl-Puffer	31
a) Einfluß verschiedener Kationen	31
b) Aktivierungskinetik durch Magnesium	32
c) Hemmung der Magnesiumaktivierung durch Calcium	33

C III. 2. bei pH 9,8 in Diäthanolaminpuffer (=AP)	34
a) Substratabhängigkeit	34
b) pH	35
c) Temperaturinaktivierung	36
d) EDTA-Hemmung und Kationenreaktivierung	37
e) Detergens (Triton X 100)	
f) SH-Blocker (p-CMB)	40
g) Hemmung der AP durch Tetramisolanalog	
R 8231	41
IV. Kompetitive Hemmung der AP durch ATP	43
D Diskussion	45
E Zusammenfassung	52
F Literatur	53

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Verteilung der Markerenzyme	S. 19
Tabelle 2: Aktivitäten zu Abb.5	S. 26
Tabelle 3: Aktivitäten zu Abb.6	S. 27
Abb.1 : Schematische Übersicht über die Präparations- technik	S. 6
Abb.2 : Absorptionsspektrum von 0,5 mM Hexocyanoferrat und 0,5 mM Hexocyanoferrit	S. 12
Abb.3 : Verteilung der AP und der Ca^{++} -ATPase	S. 19
Abb.4a-d: Morphologie der Fraktionen	S. 21-24
Abb.5 : Substratabhängigkeit der mikrosomalen Ca^{++} -ATPase	S. 26
Abb.6 : Ca^{++} -stimulierte P_i -Freisetzung aus ver- schiedenen Nucleotiden	S. 27
Abb.7 : Abhängigkeit der Ca_{frei} -Konzentration von der Ca_{tot} -Konzentration im Test unter Berücksichtigung der entsprechenden Dissoziationskonstanten	S. 29
Abb.8 : Aktivierungskinetik der Ca^{++} -ATPase für $\text{Ca}^{++}_{\text{frei}}$ vor und nach Zugabe von EDTA	S. 29
Abb.9 : Stimulation der Ca^{++} -ATPase durch Magnesium und Strontium im Vergleich zu Calcium	S. 30
Abb.10: Aktivität der p-NPPase (pH 7,4) unter dem Einfluß verschiedener Kationen	S. 31
Abb.11: Stimulation der p-NPPase (pH 7,4) der Mikrosomen durch Magnesiumionen; Stimulation der p-NPPase des Sarkolemmes durch Kaliumionen	S. 32
Abb.12: Mg^{++} -Stimulierung der p-NPPase (pH 7,4) ohne Zugabe von Ca^{++} und unter Zugabe von 0,1 und 0,5 mM Ca^{++}	S. 33
Abb.13: Substratabhängigkeit der AP	S. 34
Abb.14: pH-Abhängigkeit der AP und der Ca^{++} -ATPase	S. 35
Abb.15: Zeitabhängigkeit der Hitzeinaktivierung (56°) der Ca^{++} -ATPase und der AP	S. 36

Abb.16: Hemmung der AP und der Ca^{++} -ATPase durch EDTA	S. 37
Abb.17: Reaktivierung der AP und der Ca^{++} -ATPase nach Hemmung mit EDTA-Tris	S. 38
Abb.18: Reaktivierung der AP nach Hemmung mit EDTA-Tris durch Magnesium, Calcium und Zink	S. 38
Abb.19: Effekt von Triton X 100 auf die Aktivität der AP und der Ca^{++} -ATPase	S. 39
Abb.20: Hemmung der AP und der Ca^{++} -ATPase durch p-CMB; Reaktivierung der mit 10^{-5} M p-CMB gehemmten Ca^{++} -ATPase mit L-Cystein	S. 40
Abb.21: Hemmung der AP durch R 8231 bei konstant gehaltener p-NPP-Konzentration	S. 41
Abb.22: Substratabhängigkeit der AP ohne Hemmung und nach Hemmung mit 0,05 mM R 8231	S. 42
Abb.23: Substratabhängigkeit der AP ohne Hemmung und nach Hemmung mit 0,1 und 0,5 mM ATP	S. 43
Abb.24: Kompetitive Hemmung der AP durch ATP (Auftragung nach Lineweaver und Burk)	S. 44

Verwendete Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
c-AMP	cyclisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Äthylenglykol-bis-(2-aminoäthyläther)-N,N'-tetra- essigsäure
FSR	fraktioniertes sarcoplasmatisches Retikulum
G-6-P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanintriphosphat
HK	Hexokinase
ITP	Inosintriphosphat
k_m	Michaelis-Konstante (halbmaximale Reaktions- geschwindigkeit)
konst.	konstant
Konz.	Konzentration
MK	Myokinase
NEM	N-Ethylmaleimid
P_i	anorganisches Phosphat
p-CMB	1-,4-Chloromercuribenzoat
p-NPP	1-,4-Nitrophenylphosphat
Prot.	Protein
R 8231	Analog des Tetramisol = (+)-6(m-bromophenyl)- 5,6-dihydroimidazo (2,1-b)thiazol oxalat R 8231 wurde uns dankenswerterweise vom Herrn Borgers, Department of Cell Biology, Janssen Pharmaceutica, Research Laboratories, 2340 Beerse, Belgium, zur Verfügung gestellt
SDH	Succinatdehydrogenase
SL	Sarkolemm
TCE	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTP	Uridintriphosphat
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

A) EINLEITUNG

Seit den Untersuchungen von Kumagai (18) im Jahre 1955 ist bekannt, daß die Muskulatur einen physiologischen Erschlaffungsfaktor besitzt, der bei der Regulation des elektromechanischen Koppelungsprozesses eine wichtige Rolle spielt. Dieser Faktor ist bereits aus einer Mikrosomenfraktion des Skelettmuskels, die hauptsächlich aus Membranbestandteilen des sarcoplasmatischen Retikulums besteht, gereinigt und als ein Ca^{++} -Transportsystem charakterisiert worden (21). Im Gegensatz dazu war die Präparation reiner Membranen aus dem sarcoplasmatischen Retikulum des Herzmuskels bisher nicht möglich. Besondere Schwierigkeiten bereitete die Kontamination mit Mitochondrienfragmenten, die als Ausdruck des höheren Mitochondriengehalts des Herzmuskels im Vergleich zum Skelettmuskel gewertet worden ist (28). Die Heterogenität dieser Mikrosomenpräparation drückt sich unter anderem auch darin aus, daß zwei verschiedene Ca^{++} -ATPasen in ihr beschrieben worden sind. Während die Magnesium abhängige, durch Calcium aktivierbare ATPase (Mg^{++} -, Ca^{++} -ATPase) mit dem Calcium-Transportsystem in Verbindung gebracht wird (14), ist die Rolle der von Magnesium unabhängig durch Calcium aktivierbaren ATPase (Ca^{++} -ATPase) weitgehend unbekannt.

Zahlreiche Arbeiten aus jüngster Zeit, insbesondere aus dem Arbeitskreis von Arnold M. Katz, deuten darauf hin, daß die Mg^{++} -, Ca^{++} -ATPase des sarcoplasmatischen Retikulums am Herzmuskel einer Kontrolle durch Katecholamine unterliegt (16, 17, 33). So konnten diese Autoren ein molekularbiologisches Modell für die Verkürzung der Systolendauer durch β -Stimulatoren entwickeln (15). Danach kommt es durch Freisetzung der Katecholamine aus ihren Speichern, wie sie unter den Bedingungen des akuten Streß zu beobachten ist, zu einem Anstieg der Hormonspiegel und zu einer Besetzung der myokardialen β -Rezep-

toren. Diese Bindung der "ß-Stimulatoren" wirkt als Signal zur Aktivierung der Adenylatzyklase. Die Folge ist ein Anstieg des intrazellulären c-AMP-Spiegels. C-AMP seinerseits aktiviert im Myokard eine c-AMP-abhängige Proteinkinase, die wiederum ein Membranprotein im sarcoplasmatischen Retikulum phosphoryliert. Durch diesen Vorgang wird sowohl die Mg^{++} -, Ca^{++} -ATPase, wie auch der Ca^{++} -Rücktransport in die Ca^{++} -Speicher des sarcoplasmatischen Retikulums gesteigert. Dieser raschere Ca^{++} -Rücktransport mit Hilfe der " Ca^{++} -Pumpe" bewirkt sodann die Verkürzung der Systolendauer.

Während für die Mg^{++} -, Ca^{++} -ATPase damit ein Modell vorliegt, durch das biochemische und physiologische Vorgänge nahtlos verknüpft werden können, fehlen entsprechende Vorstellungen für die Ca^{++} -ATPase des sarcoplasmatischen Retikulums. Über die Beeinflussung dieses letzteren Enzyms liegen widersprüchliche Daten vor. Während Dietze (8) eine Stimulierung dieser Ca^{++} -ATPase durch c-AMP fand, war es Limas (19) nicht möglich, einen c-AMP-Effekt nachzuweisen.

Dieses unterschiedliche Verhalten gegenüber c-AMP warf die Frage auf, was für eine Aktivität überhaupt mit der Ca^{++} -stimulierten ATP-Hydrolyse in Rattenherzmikrosomen gemessen wird, und ob dieser Aktivität eine physiologische Bedeutung zukommt. Eine Charakterisierung dieser Aktivität setzt jedoch voraus, daß die mikrosomalen Strukturen morphologisch erfaßt und gegenüber anderen Strukturen abgegrenzt werden. Weiterhin haben sich Messungen bestimmter Enzymaktivitäten in Membranfraktionen zur Beurteilung ihres Reinheitsgrades bewährt. Allerdings hat sich gezeigt, daß die ATP-Spaltung als Ausdruck des Energieverbrauchs ein ubiquitäres Phänomen darstellt, so daß die Abgrenzung einer ATPase-Aktivität von anderen unspezifischen Phosphatasen, insbesondere

der AP, notwendig erscheint. Aus einer großen Zahl von Arbeiten geht hervor, daß ATPasen tatsächlich eine enge Beziehung zur AP haben (10,25). Untersuchungen über eine mögliche Beziehung dieser beiden Enzyme zueinander am Herzmuskel liegen bisher nicht vor. Ziel der vorgelegten Untersuchungen war es daher, am sarcoplasmatischen Retikulum des Herzmuskels die Eigenschaften der Ca^{++} -ATPase näher zu erfassen und mit der AP zu vergleichen.

B) M E T H O D I K

I) Präparation nach Dietze, G. und Hepp, K.D. (7)

1. Lösungen

- a) Sucrose-EGTA-Tris-HCl-Puffer (Puffer I) pH 7,4
- | | |
|----------------------|--------|
| - Sucrose (342,41) * | 0,25 M |
| - EGTA (360,4) | 0,5 mM |
| - Tris (121,14) | 20 mM |
| - HCl | 1 N |

85,57 g Sucrose, 190,2 mg EGTA und 2,423 g Tris werden in 0,9 l H₂O bidest. gelöst, mit 1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt und anschließend auf 1 l mit H₂O bidest. aufgefüllt.

- b) EDTA-Tris-Puffer (Puffer II) pH 7,4
- | | |
|-----------------|----------|
| - EDTA (292,25) | 2,0 mM |
| - Tris | Substanz |

584,5 mg EDTA-Säure werden in 1 l H₂O bidest. gelöst und mit Tris-Substanz auf pH 7,4 eingestellt.

- c) Tris-HCl-Puffer (Puffer III) pH 7,4
- | | |
|-----------------|-------|
| - Tris (121,14) | 20 mM |
| - HCl | 1 N |

2,423 g Tris werden in 0,9 l H₂O bidest gelöst, mit 1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt und anschließend auf 1 l mit H₂O bidest. aufgefüllt.

- d) Inkubationslösung für das Sarkolemm

- | | |
|---|---------------------------------------|
| - NaJ (169,89) | 9,9 g/10 ml Puffer III |
| - Cystein (121,16) | 606 mg/10 ml Puffer III |
| - ATP-Tris | 151 mg/10 ml H ₂ O bidest. |
| 151 mg ATP-Säure (507,2) werden in 10 ml H ₂ O bidest. gelöst und mit Tris-Salz eingestellt auf pH 7,4 | |
| - MgCl ₂ x 6 H ₂ O (203,31) | 102 mg/10 ml Puffer III |
| - EDTA-Tris | 7,3 g/10 ml H ₂ O bidest. |

7,3 g EDTA werden in 5 ml H₂O bidest. gelöst, aufgewärmt, mit Tris-Substanz auf pH 7,4 eingestellt und auf 10 ml mit H₂O bidest. aufgefüllt

*): in Klammern Molekulargewicht

Die 5 Lösungen werden wie folgt gemischt:	Die Endkonzentration im Gemisch beträgt:
--	---

NaJ-Lösung	6,00 ml	4 M
Cystein-Lösung	1,00 ml	50 mM
ATP-Tris-Lösung	2,00 ml	6 mM
MgCl ₂ -Lösung	1,00 ml	5 mM
EDTA-Lösung	<u>0,02 ml</u>	5 mM
Gesamtvolumen	10,02 ml	

e) NaCl (58,5) 0,9% = 0,154 M

2. Verlauf der Präparation (siehe auch Abb.1)

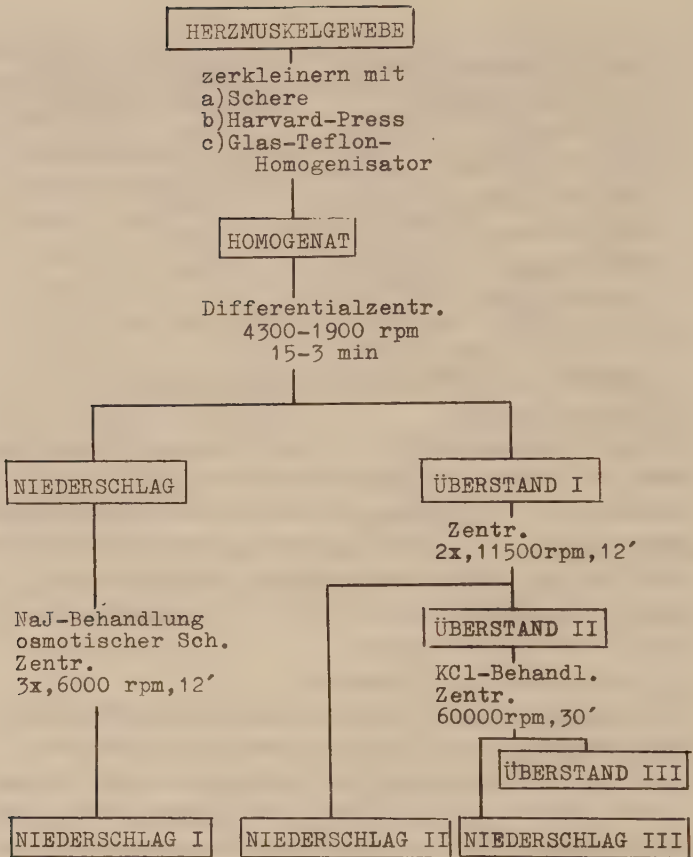
a) Homogenisation

5 Rattenherzen (Ratten: Sprague-Dawley; 150 - 200 g; männlich) werden nach Entfernung der Vorhöfe und des Epikards mit Hilfe einer Schere und der Harvard-Presse zerkleinert. Je 1 Gramm des zerkleinerten Herzmuskels wird in 5 ml Puffer I aufgenommen und mit einem 30 ml Potter-Homogenisator (Glas-Teflon) homogenisiert (3 x 10 sec.; 120 Volt).

b) Differentialzentrifugation

Das Homogenat wird 7 x zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge; Rotor SS 34), wobei die Geschwindigkeit von 4300 rpm jeweils um 400 rpm und die Zeit von anfangs 15 min jeweils um 2 min reduziert werden. Nach jeder Zentrifugation werden die Überstände gesammelt, die Niederschläge in 4 ml Puffer I pro Zentrifugenröhrchen aufgenommen und mit einem Glasstab homogenisiert. Nach der zweiten Zentrifugation wird der rehomogenisierte Niederschlag zusätzlich durch Gaze gefiltert.

Während der Niederschlag nach Differenzialzentrifugation das Ausgangsmaterial für die Sarkolemmfraktion bildet, werden aus den gesammelten Überständen (Überstand I in Abb.1) die Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion gewonnen.



Niederschlag I : Sarkolemmfraktion

Niederschlag II : Mitochondrienfraktion

Niederschlag III: Mikrosomenfraktion

Überstand I : Überstände aus den Differential-Zentrifugationen

Überstand II : Mitochondrienüberstand

Überstand III : Mikrosomenüberstand

Abb.1: Schematische Übersicht der Präparationstechnik

c) Die einzelnen Fraktionen

a) Sarkolemm

Der Niederschlag nach Differentialzentrifugation wird in 5 ml 0,9% NaCl-Lösung aufgenommen und mit dem Glasstab zerkleinert. Dazu werden tropfenweise 5 ml der Inkubationslösung gegeben. Das Homogenat wird 60 min bei 0° Celsius unter Rühren mit einem Magnetrührer inkubiert. Nach Zusatz von 15 ml eiskaltem H₂O bidest. (osmotischer Schock) wird die Mischung (Endvolumen: 25 ml) 3 x 12 min bei 6000 rpm zentrifugiert (Sorvall; Rotor SS 34). Der Niederschlag der 1. und 2. Zentrifugation wird jeweils in 25 ml Puffer II aufgenommen und mit dem Glasstab und dem 30 ml-Potter-Homogenisator (Glas-Teflon) rehomogenisiert (5 x 10 sec; 120 Volt). Die Überstände werden verworfen. Der Niederschlag der 3. Zentrifugation enthält die Sarkolemmfraktion (Abb.1), die in 2 ml Puffer II aufgenommen, mit einem 5 ml-Potter-Homogenisator (Glas-Teflon) homogenisiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren wird.

β) Mitochondrien

Der Überstand I wird zentrifugiert (11500 rpm, 12 min; Sorvall; Rotor SS 34). Der Niederschlag wird in 20 ml Puffer I aufgenommen, mit dem Glasstab rehomogenisiert und ein zweites Mal zentrifugiert (11500 rpm, 12 min). Die Überstände werden gesammelt (Überstand II). Der Niederschlag nach der 2. Zentrifugation wird in 2 ml Puffer II aufgenommen, mit dem 5 ml-Potter-Homogenisator (Glas-Teflon) homogenisiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren (Mitochondrienfraktion).

γ) Mikrosomen

Die Mitochondrienüberstände werden nach Zugabe von 26,1 mg KCl pro ml ultrazentrifugiert (60000 rpm, 30 min; Beckman-Zentrifuge LB 2; Rotor Ti 60).

Der Niederschlag enthält die Mikrosomenfraktion, die in 2 ml H₂O bidest. aufgenommen, mit einem Potter-Homogenisator (Glas-Teflon) homogenisiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren wird. Der Mikrosomenüberstand wird lyophilisiert und gegen Puffer III dialysiert.

II) Bestimmung der Proteingehalts nach Hepp, K.D. et al. (11)

Testprinzip:

1. Durch Dioxan wird das Protein aus den Lipoproteinmembranen herausgelöst.
2. Nachweis des Proteins (quantitativ) durch die Biuret-Reaktion

Testlösungen

1. Biuret-Reagens
2. Dioxan
3. Standardlösung (Labtrol^R-Standardserum)
4. TCE (0,3 M)

Testansatz:

50 µl Homogenat werden zu 1 ml Dioxan gegeben. Das Gemisch wird 5 min geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Niederschlag wird 1 ml 0,3 M TCE gegeben und wie oben verfahren. Zum
2. Niederschlag wird 1 ml Biuret-Reagens gegeben und bis zur völligen Lösung des Niederschlags (30-60 min) geschüttelt.

Die Ablesung der Extinktion erfolgt bei 546 nm. Zur Standardisierung wird Labtrol^R verwendet.

III) Methodik zur Elektronenmikroskopie

Die Niederschläge der drei Fraktionen wurden 60 min lang in 2,5% Glutaraldehyd fixiert, mit 0,15 molarem Phosphat-Puffer (pH 7,0) übernacht gewaschen und 30 min in 1% Osmium-Tetroxyd in demselben Puffer nachfixiert. Die Färbung erfolgte nach der von Luft (20) und Reynolds (29) angegebenen Methodik. Die Schnitte wurden in einem Siemens Elmiskop 101 untersucht.

IV) Phosphattest nach Müller, E. (24)

Mit Hilfe des Phosphattests wurde das durch die Ca^{++} -, Mg^{++} -, oder $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase gebildete Phosphat bestimmt.

Testlösungen:

- 1) 0,5% 2,4-Diaminophenolhydrochlorid (Amidol^R) in 5% Natriumsulfit
- 2) 2,5% Ammoniummolybdat in 5-N H_2SO_4
- 3) Phosphatstandard (Labtrol^R)

Testansatz:

Überstand	0,100 ml
Amidol ^R	0,050 ml
Ammoniummolybdat	0,100 ml
H_2O bidest.	<u>0,750 ml</u>
Testvolumen	1,000 ml

Das Gemisch wird nach 7 min Inkubation bei 37°C im Eisbad gekühlt. Die Extinktion wird bei 578 nm ($d=1\text{cm}$) in einem Eppendorf-Photometer gemessen.

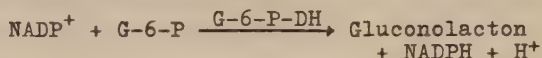
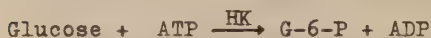
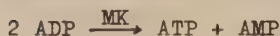
Der Versuch wurde mit Phosphat-Standardlösung geeicht.

V) Bestimmung der Enzymaktivitäten

- 1) Bestimmung der Myokinase-(MK = ATP:AMP-Phosphotransferase E.C.2.7.4.3.)aktivität
nach Sottocasa, G.L. et al. (31)

Testprinzip:

Die Bestimmung der Aktivität erfolgt über die Disproportionierung von ADP zu ATP und AMP, wobei ATP mit Hilfe der Hexokinase(HK)/Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase(G-6-P-DH)-Reaktion nachgewiesen wird.



Bilanzreaktion:



Testlösungen:

Testansatz:

			(ml)	(mM im Test)
Tris-HCl-Puffer	pH 7,4	500 mM	0,100	50
Na-ADP		50 mM	0,100	5
D-Glucose		100 mM	0,100	10
MgSO ₄		50 mM	0,100	5
NADP ⁺		2 mM	0,100	0,2
H ₂ O bidest.		--	0,485	--

Hilfsenzymgemisch

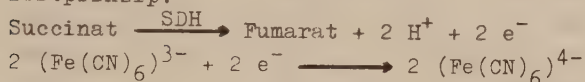
(= 1 Teil HK (1400 E/ml), gemischt
mit 1 Teil G-6-P-DH (700 E/ml))

Fraktion	--	<u>0,010</u>	--
Testvolumen		1,000 ml	

Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 µl der Fraktion gestartet. Die Aktivität der Myokinase ergibt sich aus der Extinktionsabnahme/min bei 25°C und 334 nm Wellenlänge.

2) Bestimmung der Succinatdehydrogenaseaktivität (SDH)
nach SINGER, T.P. et al. (29)

Testprinzip:



Testlösungen:

		Testansatz:	
		(ml)	(mM i. Test)
K ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄ -Puffer, pH 7,4	200 mM	0,50	54
Titriplex III (EDTA-Na)	83 mM	0,06	2,7
KCN	15 mM	0,08	0,65
MgCl ₂	125 mM	0,08	5,4
K ₃ (Fe(CN) ₆)	125 mM	0,08	5,4
Fraktion (SDH)	--	0,05	--
Succinat	250 mM	<u>1,00</u>	135,0
	Testvolumen	1,85 ml	

Nach 10 min Vorlauf bei 25°C wird die Reaktion mit der Succinatlösung gestartet. Die Aktivität der SDH ergibt sich aus der Aktivitätsabnahme/ min bei 25°C und 405 nm.

Da für die Messung der Extinktion nur ein Filter von 405 nm Wellenlänge zur Verfügung stand und für diese Wellenlänge keine Angaben über den mikromolaren Extinktionskoeffizienten von Hexocyanoferrat und Hexocyanoferrit vorlagen, wurde dieser durch Messung des Absorptionsspektrums beider Komplexe mit dem Beckman-Spektralphotometer DB - G ermittelt.

Berechnung des mikromolaren Extinktionskoeffizienten:

Aus Glchn. (1), Seite erhält man durch Umwandlung:

$$\epsilon = \frac{\Delta E}{c \times d} \quad (\mu\text{Mol/ml})$$

$C = \text{Konzentration } (\mu\text{Mol/ml})$
 $\Delta E = \text{Extinktion (siehe Abb. 2)}$
 $\epsilon = \text{mikromolarer Extinktionskoeffizient } (\text{cm}^2/\mu\text{Mol})$

für E₄₀₅ = 0,448 u. c = 0,5 mM

ergibt sich ein mikromolarer $d = \text{Schichtdicke (cm)}$

Extinktionskoeffizient von

$$\underline{\epsilon = 0,896 \text{ (cm}^2/\mu\text{Mol)}}$$

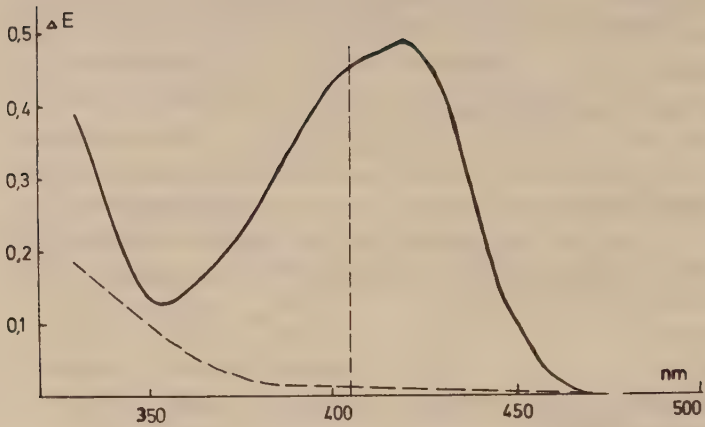
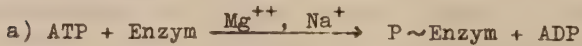


Abb.2: Absorptionsspektrum von 0,5 mM Hexocyanoferrat (III) $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ und 0,5 mM Hexocyanoferrit (II) $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$.

3) Bestimmung der Na^+ - K^+ -ATPase-Aktivität
nach Post, R.L. und Sen, A.K. (26)

Testprinzip:



Die K^+ -stimulierte Dephosphorylierung wird durch Strophantin gehemmt.

Testlösungen:

Tris-HCl-Puffer,	pH 7,4	500 mM
Tris-ATP,	pH 7,4	30 mM
MgCl ₂		100 mM
NaCl		1,4 x 10 ³ mM
KCl		140 mM
EDTA-Tris-Salz,	pH 7,4	5 mM
g-Strophanthin reinst.		1 mM
TCE	55%	

Testansatz (Volumenangaben in ml):

	mM im Test	Leer- wert	Mg- ATPase	Mg-Na-K- ATPase	Mg-Na-K- ATPase + Strophanthin
Tris-HCl-Puffer	50	0,01	0,01	0,01	0,01
Tris-ATP	3	0,01	0,01	0,01	0,01
MgCl ₂	10	--	0,01	0,01	0,01
NaCl	140	--	--	0,01	0,01
KCl	14	--	--	0,01	0,01
EDTA-Tris	0,5	0,01	0,01	0,01	0,01
g-Strophanthin	0,1	--	--	--	0,01
H ₂ O	--	0,06	0,05	0,03	0,02
Fraktion	--	<u>0,01</u>	<u>0,01</u>	<u>0,01</u>	<u>0,01</u>
Testvolumen		0,10	0,10	0,10	0,10

Die Reaktion wird gestartet durch Zusatz der Fraktion. Das Gemisch wird 20 min bei 37°C inkubiert und gestoppt durch Zusatz von jeweils 0,02 ml 55% TCE. Nach Zentrifugation wird der Phosphatgehalt im Überstand bestimmt (siehe Phosphattest).

- 4) Bestimmung der durch Calcium stimulierbaren ATPase-Aktivität nach Dietze, G. und Hepp, K.D. (8).

Der Test besteht aus 2 Teilen:

- a) Der Reaktion $\text{ATP} \xrightarrow{\text{Ca}^{++}} \text{ADP} + \text{P}_i$
 b) Dem Nachweis des gebildeten anorganischen Phosphats (P_i) mit Hilfe des Phosphattests.

Testlösungen:

Tris-HCl-Puffer	pH 7,4	100 mM
EDTA-Tris	pH 7,4	5 mM
ATP-Tris	pH 7,4	30 mM
CaCl_2		20 mM
TCE 55%		

Testansatz:

	mM im Test	Leerwert(ml)	Probe(ml)
Tris-HCl-Puffer	10	0,01	0,01
EDTA-Tris	0,5	0,01	0,01
ATP-Tris	3	0,01	0,01
CaCl_2	2	--	0,01
H_2O bidest.	-	0,06	0,05
Fraktion	-	<u>0,01</u>	<u>0,01</u>
Testvolumen:		0,10	0,10

Die Reaktion wird gestartet durch Zusatz der Fraktion.

Das Gemisch wird 20 min bei 37°C inkubiert und gestoppt durch Zusatz von jeweils 0,02 ml 55% TCE.

Nach Zentrifugation wird der Phosphatgehalt im Überstand mittels des Phosphattests bestimmt.

Wird das Homogenat (Fraktion) vorinkubiert, so werden von diesem Ansatz 0,02 ml in den Ca^{++} -ATPase-Test eingesetzt, wobei das Testvolumen konstantgehalten wird.

5) Bestimmung der p-NPPase-Aktivität

a) bei pH 7,4

Testlösungen:

Tris-HCl-Puffer	pH 7,4	500 mM
-----------------	--------	--------

Na ₂ -p-NPP		100 mM
------------------------	--	--------

Testansatz:

	ml	mM im Test
Tris-HCl-Puffer	0,01	50
Na ₂ -p-NPP	0,01	10
H ₂ O bidest.	0,07	--
Fraktion	<u>0,01</u>	--

Testvolumen: 0,10

Die Reaktion wird gestartet durch Zusatz der Fraktion. Das Gemisch wird 10 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit 20 µl 30% TCE gestoppt. Nach Zentrifugation werden zu 100 µl Überstand 200 µl einer 1 N NaOH-Lösung gegeben. Die Ablesung der Extinktion erfolgt bei 405 nm.

b) bei pH 9,8

nach Walter, K. und Schütt, Ch. (33)

Testlösung:

Puffer-Substrat-Gemisch (1,0 Diäthanolaminpuffer, pH 9,8; 15 mM p-NPP)

10,514 g Diäthanolamin + 0,557 g p-NPP + 9,0 ml 1 N HCl werden in 80 ml H₂O bidest. gelöst, mit 1 N HCl auf pH 9,8 eingestellt und mit H₂O bidest. ad 100 ml aufgefüllt.

Testansatz:

Nach 10 min Vorlauf bei 25°C wird die Reaktion durch Einbringen von 10 µl der Fraktion in 1000 µl des Puffer-Substrat-Gemisches gestartet. Die Aktivität der AP ergibt sich aus der Extinktionsabnahme/min bei 25°C und 405 nm Wellenlänge.

Abweichende Testlösung und Testansatz bei Vorinkubation des Enzyms: Das Puffer-Substrat-Gemisch wird nicht ad 100, sondern ad 90 ml mit H₂O bidest. aufgefüllt. Dadurch besteht die Möglichkeit, 100 µl der vorinkubierten Fraktion in 900 µl des Puffer-Substrat-Gemisches zu geben, wobei die Testkonzentration desselben konstant gehalten wird.

Einfluß des pH auf den Test:

Der Diäthanolaminpuffer wurde auf verschiedene pH-Werte eingestellt. Gemessen wurde die Extinktionsabweichung gegenüber dem Wert bei pH 9,8. Im Bereich von 7,6 - 10,6 ist die gemessene Extinktion konstant. Im sauren pH-Bereich fällt sie dagegen stark ab.

VI) Mathematische Auswertung

1) Berechnung der spezifischen Aktivität

nach

Folgende Abkürzungen finden Verwendung:

ϵ : mikromolarer Extinktionskoeffizient ($\text{cm}^2/\mu\text{Mol}$)

E : Extinktion

ΔE : Extinktionsänderung

V : Testvolumen (ml)

v : Probevolumen im Test (ml)

t : Zeit (min)

Δt : Meßzeitintervall (min)

d : Schichtdicke (cm)

c : Konzentration ($\mu\text{Mol/ml}$; $\mu\text{g/ml}$)

1 mU = 1 $\mu\text{Mol/min}$

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz errechnet sich die Umsetzungsrate aus der Änderung der Extinktion:

$$(1) \quad c = \frac{\log I/I_0}{\epsilon \cdot d} = \frac{E}{\epsilon \cdot d} \quad (\mu\text{Mol/ml}) \quad (\text{im Testansatz})$$

Für chemische Umsetzungen ergibt sich hieraus:

$$(2) \quad c = \frac{\Delta E \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot v} \quad (\mu\text{Mol/ml}) \quad (\text{in der Probe})$$

Unter Berücksichtigung des Meßzeitintervalls erhält man die Volumenaktivität; d.h. die Menge an Metaboliten/Zeiteinheit bezogen auf das Probevolumen:

$$(3) \quad \text{Volumenaktivität} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{V}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot 10^3 \quad (\text{mU/ml}) \quad (\text{in der Probe})$$

Die spez. Aktivität, d.h. die Umsetzungsrate/Zeiteinheit/mg Protein errechnet sich folgendermaßen:

$$(4) \quad \text{spez. Aktivität} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{V}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot \frac{1}{c_{\text{Prot.}}} \cdot 10^3 \quad (\text{mU/mg}_{\text{Prot.}})$$

Im Speziellen ergeben sich folgende spez. Aktivitäten:
für die Ca⁺⁺-aktivierte ATPase ($\epsilon = 2,6 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$)

$$\text{spez. Akt.} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot 46,15 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{c_{\text{Prot.}}} \quad (\text{mU/mg}_{\text{Prot.}})$$

für die AP ($\epsilon = 18,5 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$)

$$\text{spez. Akt.} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot 5,459 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{c_{\text{Prot.}}} \quad (\text{mU/mg}_{\text{Prot.}})$$

für die AP nach Vorinkubation

$$\text{spez. Akt.} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot 5,948 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{c_{\text{Prot.}}} \quad (\text{mU/mg}_{\text{Prot.}})$$

für die p-NNPase (pH 7,4) ($\epsilon = 15,58 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$)

$$\text{spez. Akt.} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot 2,31 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{c_{\text{Prot.}}} \quad (\text{mU/mg}_{\text{Prot.}})$$

für die Myokinase ($\epsilon = 6,0 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$)

$$\text{spez. akt.} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot 16,92 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{c_{\text{Prot.}}} \quad (\text{mU/mg}_{\text{Prot.}})$$

für die SDH ($\epsilon = 0,896 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$)

$$\text{spez. Akt.} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot 41,29 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{c_{\text{Prot.}}} \quad (\text{mU/mg}_{\text{Prot.}})$$

2) Statistik

Aus den ermittelten Werten wurde das arithmetische Mittel ($\bar{x}$) sowie die Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) berechnet. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte durch den Student-T-Test für unverbundene Stichproben. Statistisch gesicherte Differenzen wurden ab einem $p \ 0,05$ angenommen. Die Kationenaktivierungskonstante k_a oder Michaeliskonstante k_m und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurden mathematisch durch Bestimmung der linearen Regression mit einem Olivetti-Computer-Programm aus der Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt.

C) E R G E B N I S S E

I) Vergleich der Fraktionen untereinander und mit dem Gesamthomogenat

1. Enzymmuster

Tabelle I: Verteilung der Markerenzyme (mU/mg Prot.)

	Proben	Homogenat	Sarkolemm	Mitochondrien	Mikrosomen	Überstand
Mg ⁺⁺ -Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	29	134,4 ± 24 ^{*)}	83,08 ± 5,77	110,62 ± 6,18	650,17 ± 16,07	n.n.
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	29	n.n. ^{**)}	46,64 ± 2,50	n.n.	24,07 ± 1,70	n.n.
Strophantin hemmbare Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	29	n.n.	29,15 ± 1,90	n.n.	13,04 ± 1,20	n.n.
SDH	24	99,3 ± 1,96	17,65 ± 2,62	219,85 ± 12,43	90,45 ± 9,94	n.n.
MK	5	556,5 ± 21	n.n.	47,65 ± 11,45	185,5 ± 42,7	2470 ± 61

^{*)} Aktivitäten ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) in mU/mg Prot.

^{**)} n.n.: nicht nachweisbar

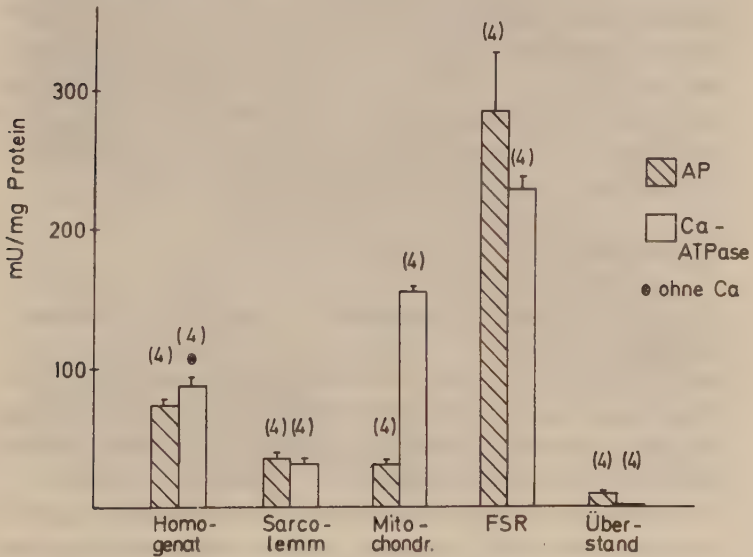


Abb. 3: Verteilung der AP und der Ca⁺⁺-ATPase

Als Markerenzyme dienen für das Sarkolemm und die Mikrosomen die $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, für die Mitochondrien die SDH und für den Überstand die MK. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, liegt die Aktivität der $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ im Sarkolem etwa doppelt so hoch wie in den Mikrosomen. Aus der Bestimmung der SDH- Verteilung geht hervor, daß die Mikrosomen mit mitochondrialem Protein kontaminiert sind. Andererseits zeigt sich, daß auch ein Teil der löslichen Myokinase mit der Mikrosomen - fraktion sedimentiert. Allerdings ist die spezifische Aktivität dieses Enzyms in der Mikrosomenfraktion um das 13-fache niedriger als im postmikrosomalen Überstand.

Die Abb. (3) zeigt, daß AP und $\text{Ca}^{++} - \text{ATPase}$ mit Ausnahme der Mitochondrienfraktion und des postmikrosomalen Überstandes ein nahezu identisches Verteilungsmuster aufweisen. Die AP läßt sich in den Mikrosomen um das 4-fache, die $\text{Ca}^{++} - \text{ATPase}$ um das 2,5-fache gegenüber dem Gesamthomogenat anreichern. Es erweist sich, daß nahezu die gesamte Aktivität der AP und der $\text{Ca}^{++} - \text{ATPase}$ membrangebunden vorliegt.

2. Morphologie

Abb. 4a-d zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen der Fraktionen.

Abb. 4a zeigt ein elektronenmikroskopisches Bild des Niederschlags vor NaJ -Behandlung. Es sind quergestreifte Muskelfasern zu erkennen, zwischen die kettenartig Mitochondrien eingelagert sind. Zusätzlich werden Strukturen des sarkoplasmatischen Retikulums sichtbar in Form von teils länglich, teils ringförmig angeordneten Tubuli, die sich in die Muskelfasern hinein erstrecken. Die Muskelfasern werden durch das Sarkolemm

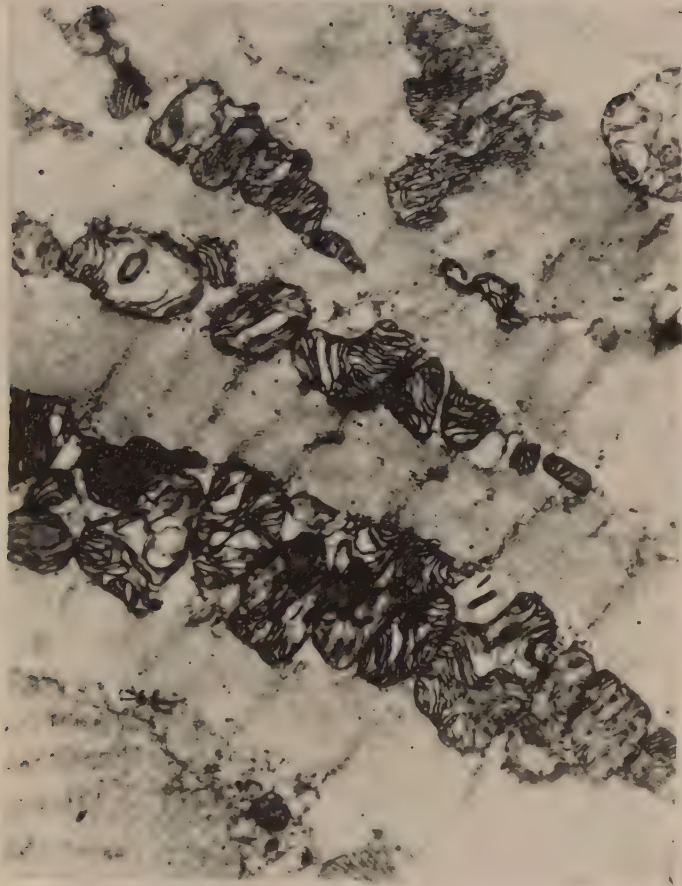


Abb.4a: Myofibrillen

Vergr. 24000 fach

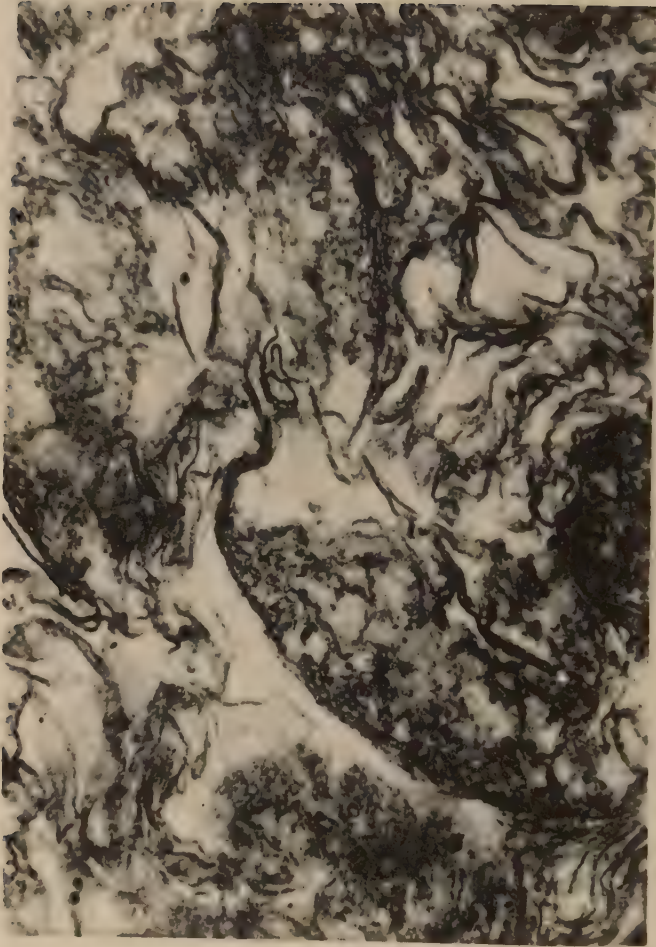


Abb.4b: Sarkolemmfraktion

Vergr. 120000 fach



Abb. 4c: Mitochondrienfraktion

Vergr. 39000 fach

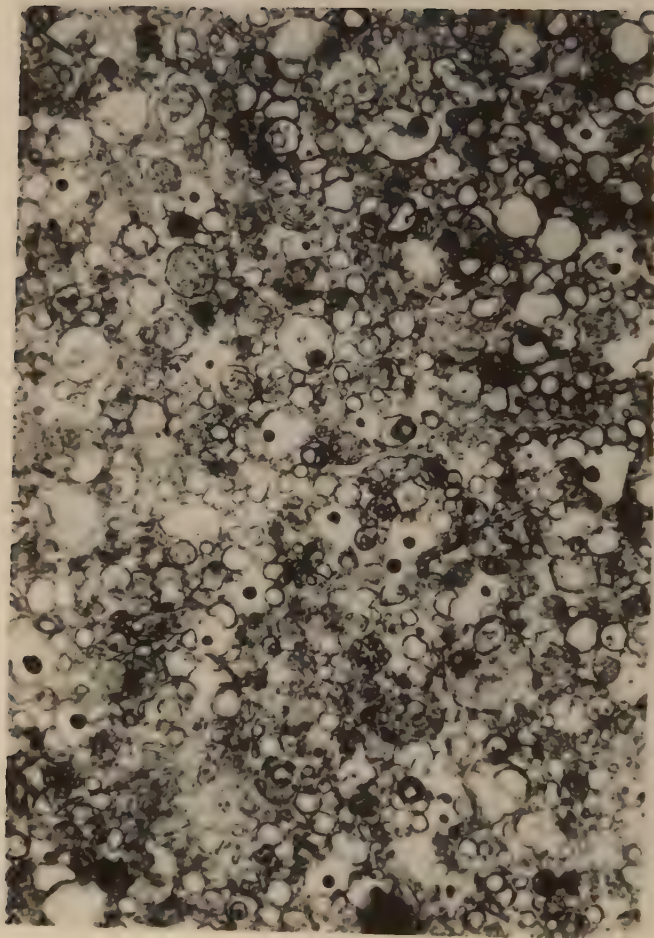


Abb.4d: Mikrosomenfraktion

Vergr. 30000 fach

begrenzt. Diese Fraktion enthält also alle Membranstrukturen des Herzmuskels noch nebeneinander.

Abb. 4b zeigt blattförmig ausgebreitete Membranen, wobei sich diese gelegentlich doppelläufig nebeneinander anlagern.

Abb. 4c gibt dichtgepackt aneinadergelagerte ovale Gebilde wider, die sowohl knäuelartig geschlängelte als auch parallelstreifig gelagerte Membranen enthalten. Abb. 4d zeigt dichtgelagerte Bläschen von unterschiedlicher Größe, die neben optisch leer erscheinenden Strukturen amorphes oder granuliertes Material enthalten. Einige Strukturelemente lassen aufgrund ihrer Parallelstreifigkeit an Mitochondrienfragmente denken.

II) Charakterisierung der mikrosomalen Ca^{++} -ATPase

1. Substratabhängigkeit

Die Substratkonzentration ist bezogen auf die ATP-Gesamtkonzentration = $\text{ATP}_{\text{total}}$ mit konstanter Ca^{++} -Gesamtkonzentration = $\text{Ca}^{++}_{\text{total}}$ von 2 mM im Test.

Tabelle 2: Aktivitäten zu Abb.5 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). N = 3 Präp.

ATP (mM)	Aktivität (mU/mg Protein)
0,25	53,17 $\pm$ 0,9
0,50	86,5 $\pm$ 2,1
0,75	119,17 $\pm$ 3,7
1,00	142,33 $\pm$ 1,9
2,00	197,0 $\pm$ 6,7
4,00	221,33 $\pm$ 3,6

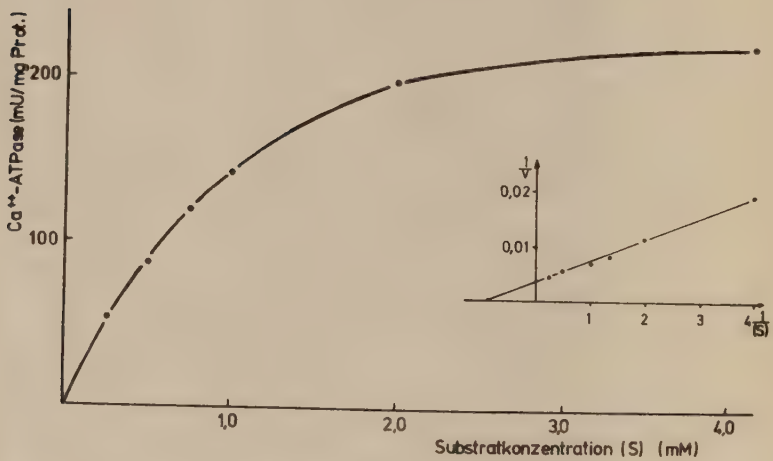


Abb.5: Substratabhängigkeit der mikrosomalen Ca^{++} -ATPase

Aus der Berechnung der linearen Regression der Kehrwerte von (S) gegen v ergibt sich die Gleichung:

$$\frac{1}{v} = 0,00334 + 0,00389 \times \frac{1}{(S)};$$

daraus folgt: $v_{\text{max}} = 299,4$ mU/mg Prot.; $k_m = 1,16$ mM

2. Substratspezifität

Hier interessierte uns, inwieweit ATP durch andere Nukleotide ersetzbar ist

Die Konzentration der Nukleotide betrug konstant 3 mM, die Calcium-Gesamtkonzentration 2 mM

Tabelle 3: Aktivitäten zu Abb.6 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) N = 3 Präp.

Nukleotid	Aktivität (mU/mg Protein)
ATP	$289,7 \pm 14,3$
ADP	$94,9 \pm 3,7$
AMP	1,7
GTP	$304,6 \pm 17,3$
ITP	$392,0 \pm 24,1$
UTP	$400,2 \pm 26,8$

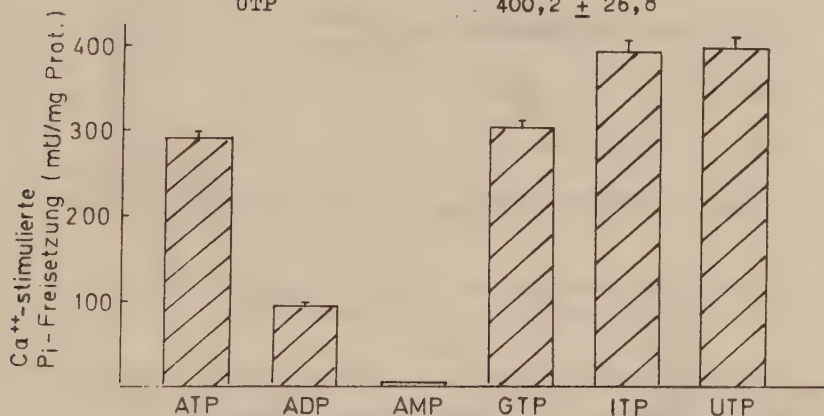


Abb.6: Ca⁺⁺-stimulierte P_i-Freisetzung aus verschiedenen Nukleotiden

Ergebnis: GTP wird in gleicher Weise wie ATP hydrolysiert, dagegen ist die P_i-Freisetzung aus ITP ($p < 0,02$) und UTP ($p < 0,05$) signifikant erhöht. ADP wird nur etwa zu 30% ($p < 0,001$) im Vergleich zu ATP gespalten, die Spaltung von AMP in Anwesenheit von Ca⁺⁺ kann vernachlässigt werden.

3. Aktivierungskinetik der mikrosomalen Ca^{++} -ATPase durch freies Calcium ($\text{Ca}^{++}_{\text{frei}}$).

a) Berechnung der Konzentration der freien Ca^{++} -Ionen ($\text{Ca}^{++}_{\text{frei}}$) in einer Lösung mit bekannter Gesamtmenge ATP (ATP_{tot}) und bekannter Gesamtmenge Calcium ($\text{Ca}^{++}_{\text{tot}}$)

$$\text{I) } \text{ATP}_{\text{tot}} = \text{ATP}^{4-} + \text{HATP}^{3-} + \text{CaATP}^{2-} = b$$

$$\text{II) } \text{Ca}^{++}_{\text{tot}} = \text{Ca}^{++}_{\text{frei}} + \text{CaATP}^{2-} = a$$

Folgende Dissoziationskonstanten sind bekannt:

$$\text{IIIa) } k_1 = \frac{(\text{Ca}^{++}_{\text{frei}})(\text{ATP}^{4-})}{(\text{CaATP}^{2-})} = 10^{-4,5} \quad (14)$$

$$\text{IIIb) } k_2 = \frac{(\text{ATP}^{4-})(\text{H}^+)}{(\text{HATP}^{3-})} = 10^{-6,48}$$

$$\text{IV) } c = k_1 \times \frac{(\text{H}^+)}{k_2}$$

$$\text{V) } d = a + b + c$$

$$\text{aus I - V folgt: } (\text{Ca}^{++}_{\text{frei}}) = a - \frac{d}{2} \pm \sqrt{\frac{d^2}{4} - a \times b}$$

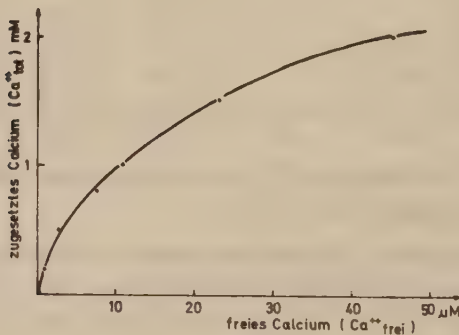


Abb.7: Abhängigkeit der $\text{Ca}^{++}_{\text{frei}}$ -Konzentration von der $\text{Ca}^{++}_{\text{tot}}$ -Konzentration im Test unter Berücksichtigung der entsprechenden Dissoziationskonstanten

b) Da durch die Zugabe von EDTA nicht nur die noch in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Kationen, sondern auch ein Teil der zugegebenen Ca^{++} -Ionen abgefangen werden, müssen wir eine Aktivierungskinetik mit und ohne EDTA aufstellen.

Diese Messung ist notwendig, da die Dissoziationskonstante von Ca-EDTA unter den für uns geltenden Versuchsbedingungen nicht bekannt ist.

Ergebnis: Abb.8 zeigt, daß die Aktivierungskinetik für Ca^{++} frei durch EDTA um 7 μM verschoben wird.

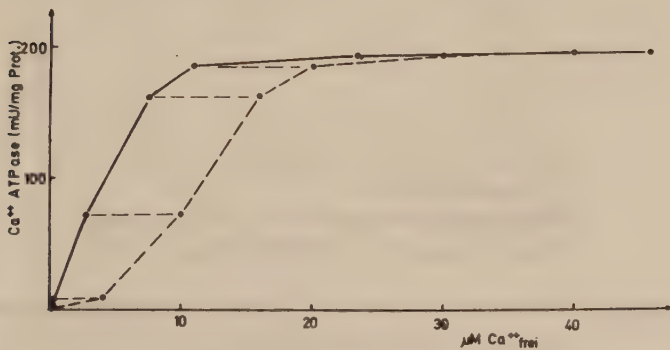


Abb.8: Aktivierungskinetik der Ca^{++} -ATPase für Ca^{++} frei ohne •————• und nach •-----• Zugabe von EDTA.

4. Aktivator-Spezifität der mikrosomalen Ca^{++} -ATPase

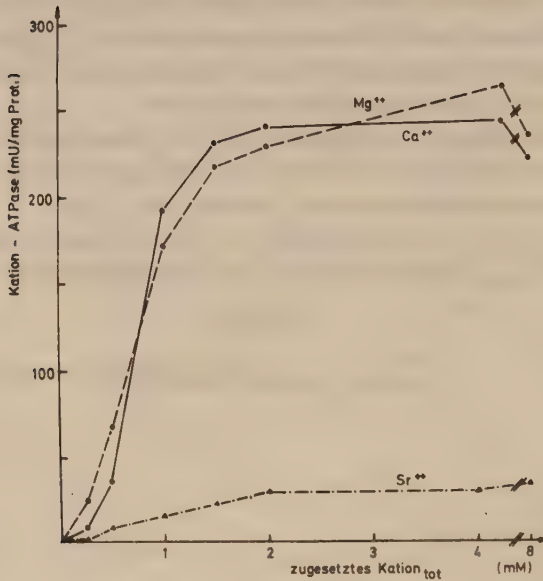


Abb.9: Stimulation der Ca^{++} -ATPase durch Magnesium $\circ$ ----- $\circ$ und Strontium $\triangle$ ----- $\triangle$ im Vergleich zu Calcium $\bullet$ ----- $\bullet$.

Ergebnis: Die ATP-Spaltung wird durch Magnesium und Calcium in nahezu identischer Weise stimuliert. Strontium stimuliert die ATP-Spaltung nur zu 10% im Vergleich zu Magnesium oder Calcium. Durch Barium ließ sich die Kation-ATPase nicht aktivieren, da Barium mit ATP einen Komplex bildet und ausgefällt wird. Der sigmoidale Verlauf der Kurven kommt durch das Abfangen der Kationen durch EDTA im niederen Konzentrationsbereich zustande.

III) Vergleich mit der mikrosomalen p-NPPase

1. bei pH 7,4 in Tris-HCl-Puffer

a) Einfluß von Ca^{++} -, Mg^{++} - und K^{+} -Ionen

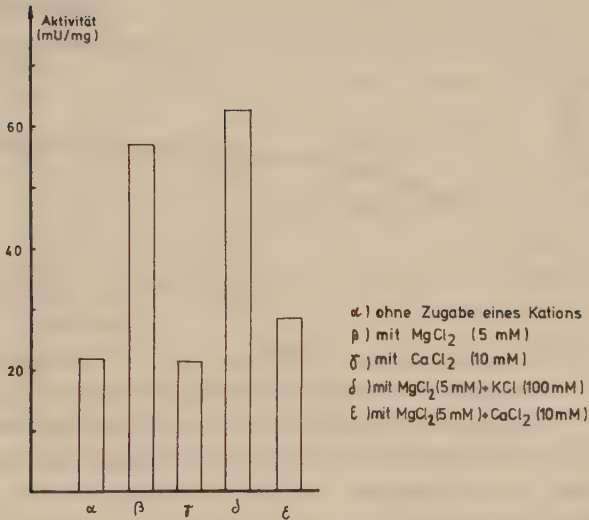


Abb.10: Aktivität der p-NPPase unter dem Einfluß verschiedener Kationen

Ergebnis: Wie aus Abb.10 hervorgeht, hat Magnesium eine stark stimulierende Wirkung auf die p-NPPase-Aktivität (β). Calcium allein hat keinen Einfluß auf die Aktivität (γ), hemmt jedoch die Magnesiumaktivierung (ϵ). In Anwesenheit von Magnesium aktiviert Kalium zusätzlich um ca. 10% (δ).

b) Aktivierungskinetik durch Magnesiumionen

Es wird die Aktivität der p-NPPase (pH 7,4) in der Mikrosomenfraktion unter Zugabe von Magnesiumionen in den Konzentrationen von 0,1 - 10 mM bestimmt.

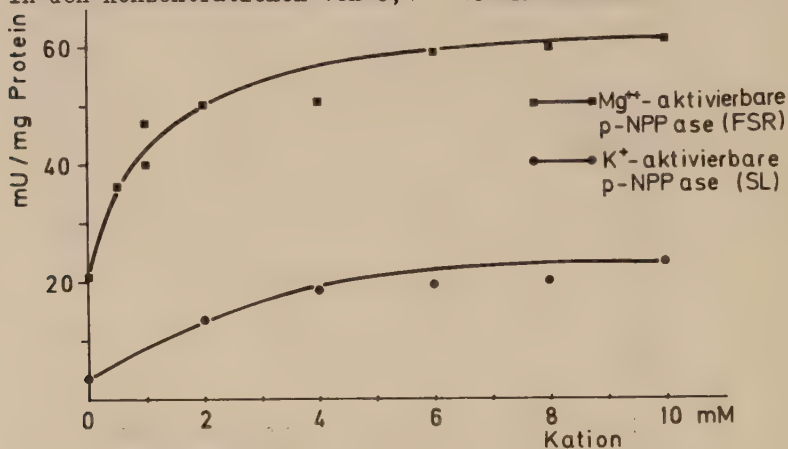


Abb. 11: Stimulation der p-NPPase (pH 7,4) der Mikrosomen durch Magnesiumionen, Stimulation der p-NPPase des Sarkolems durch Kaliumionen
In der Sarkolemmfraktion stimuliert Magnesium die p-NPPase nicht, dagegen verdreifacht Kalium die p-NPPase-Aktivität.

Aus der Berechnung der linearen Regression der Kehrwerte von (S) gegen die Kehrwerte von v ergibt sich für die durch Magnesium aktivierte p-NPPase:

$$k_m = 1,806 \text{ mM MgCl}_2$$

$$v_{\max} = 77,14 \text{ mU/mg Protein}$$

c) Hemmung der Magnesiumaktivierung durch Calcium
Wir bestimmen die Aktivität der p-NPPase (pH 7,4)
unter Veränderung der MgCl_2 -Konzentration (1 - 10 mM)
ohne Zugabe von CaCl_2 und unter Zugabe von CaCl_2
(0,1 und 0,5 mM)

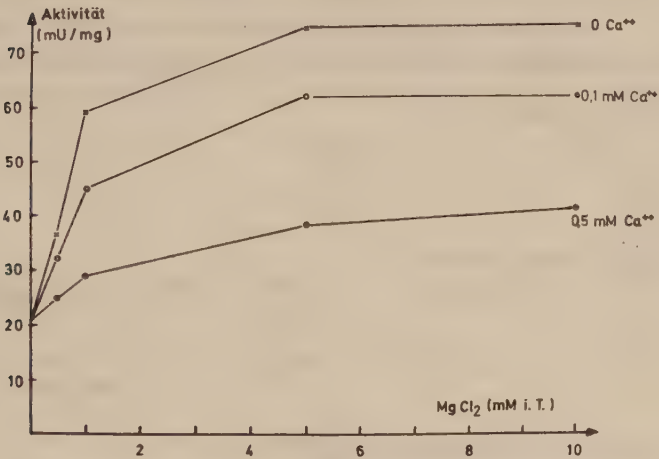


Abb. 12: Mg^{++} -Stimulierung der p-NPPase (pH 7,4) ohne
Zugabe von Ca^{++} und unter Zugabe von 0,1 und
0,5 mM Ca^{++}

2. bei pH 9,8 in Diäthanolaminpuffer

a) Substratabhängigkeit

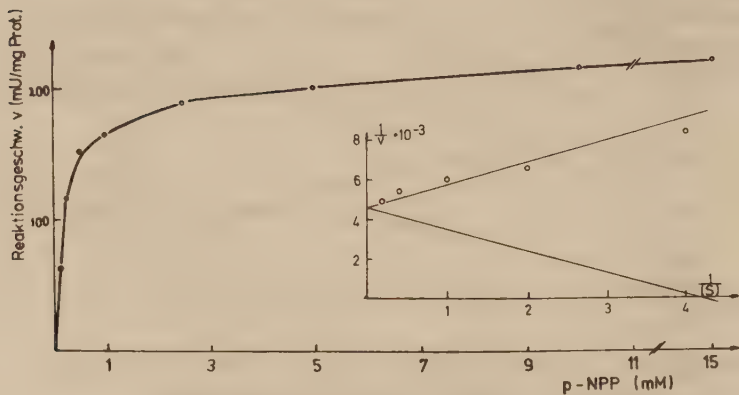


Abb. 13: Substratabhängigkeit der AP

Ergebnis: Die Auftragung nach Lineweaver und Burk ergibt eine lineare Regressionsgerade mit der Gleichung:

$$\frac{1}{v} = 0,00457 + 0,00110 \times \frac{1}{[S]}$$

Daraus ergibt sich:

$$v_{\max} = 218,63 \text{ mU/mg Protein}; k_m = 0,2400 \text{ mM p-NPP}$$

b) pH-Abhängigkeit der Ca^{++} -ATPase und der AP

Die Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Ca^{++} -ATPase wurde im pH-Bereich 5,2 - 8,6 mit einem Tris-Maleat-Puffer, im Bereich 8,6 - 12,8 mit einem Glycin-NaCl-NaOH-Puffer anstelle des sonst verwendeten Tris-HCl-Puffers durchgeführt.

Das pH des Puffer-Substrat-Gemisches für die AP wurde durch ein unterschiedliches Mischungsverhältnis HCl : Diäthanolamin bei konst. Diäthanolaminkonzentration variiert.

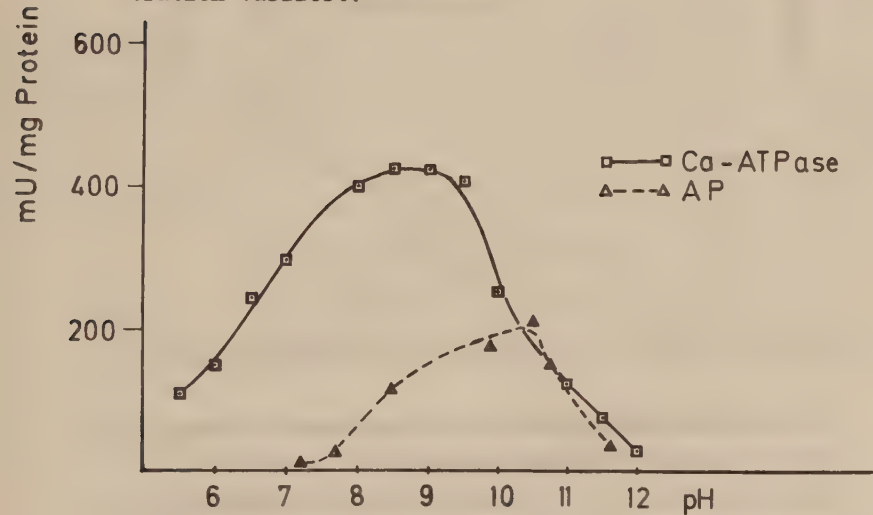


Abb. 14: pH-Abhängigkeit der AP und der Ca^{++} -ATPase

Ergebnis: Für die Ca^{++} -stimulierte ATP-Hydrolyse finden wir ein pH-Optimum zwischen pH 8,5 und 9,5; für die AP zwischen pH 9,5 und 10,5. Zwischen pH 10,0 und 11,5 sind die Aktivitäten der Ca^{++} -ATPase und der AP deckungsgleich.

c) Temperaturinaktivierung der Ca^{++} -ATPase und der AP
Die Enzymfraktion wird bei 56°C zwischen 1 und 10 min vorinkubiert und durchläuft anschließend den jeweiligen Test.

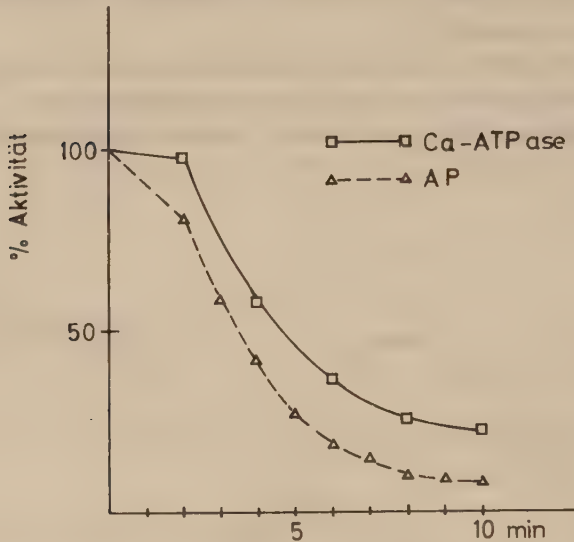


Abb.15: Zeitabhängigkeit der Hitzeinaktivierung (56°C)
der Ca^{++} -ATPase und der AP

Ergebnis: Die AP wird etwas schneller inaktiviert als die Ca^{++} -ATPase. Die halbmaximale Hemmung ist bei der AP nach 3,5 min, bei der Ca^{++} -ATPase nach 4,5 min Vorinkubation bei 56°C erreicht.

Nach 10 min hat die AP noch eine Restaktivität von 4%, die Ca^{++} -ATPase von 10% der Ausgangsaktivität.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der beiden Phosphatasen ist jeweils bei 25°C und bei 37°C nahezu identisch.

d) EDTA-Hemmung und Kationenreaktivierung

α) Hemmung der Phosphatasen durch EDTA

Das Ferment wurde in der EDTA-Lösung 10 min bei 37°C vorinkubiert. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf den Test und liegen in der Vorinkubation um den Faktor 10 höher.

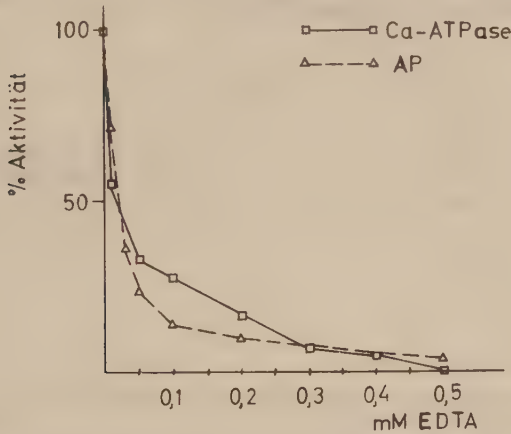


Abb.16: Hemmung der AP und der Ca^{++} -ATPase durch EDTA

β) Reaktivierung der mit 0,5 mM EDTA gehemmten Ca^{++} -ATPase bzw. der mit 0,2 mM EDTA submaximal gehemmten AP durch Ca^{++} -Ionen (0,1 - 2,0 mM)

Ergebnis (siehe auch Abb.17): Die AP läßt sich durch Ca^{++} -Ionen nach Hemmung auf 20% der Ausgangsaktivität praktisch nicht reaktivieren. Im Gegensatz hierzu kann die Ca^{++} -ATPase-Aktivität bis zum 7-fachen der Ausgangsaktivität nach vollständiger Hemmung reaktiviert werden

γ) Reaktivierung der durch 0,2 mM EDTA submaximal gehemmten AP durch Zugabe von Calcium (1mM), Magnesium (1 mM) und Zink (0,01 - 0,5 mM).

Ergebnis (siehe Abb. 18): Die Aktivität steigt nach Hemmung auf 20% durch Zugabe von 0,01 mM Zink zusätzlich zu Calcium und Magnesium (je 1 mM) wieder auf 60% der Ausgangsaktivität an. Bei höheren Konzentrationen von Zink ist der Aktivitätsanstieg geringer.

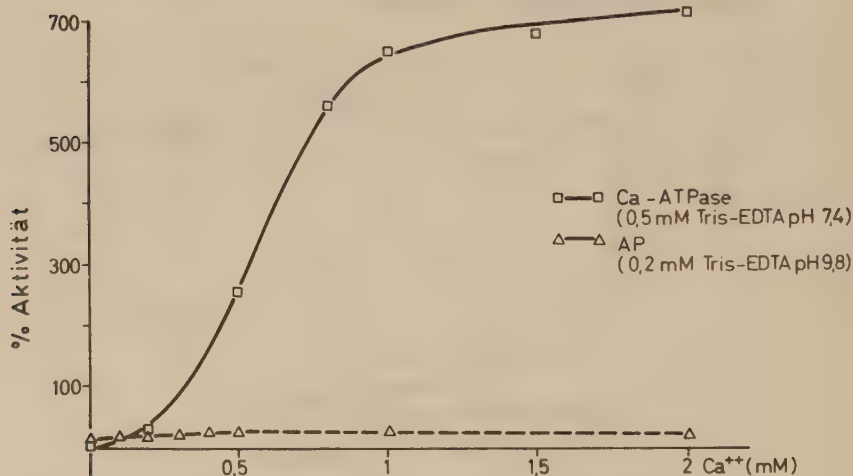


Abb. 17: Reaktivierung der AP und der Ca⁺⁺-ATPase nach Hemmung mit EDTA-Tris. (100% = Aktivität ohne EDTA)

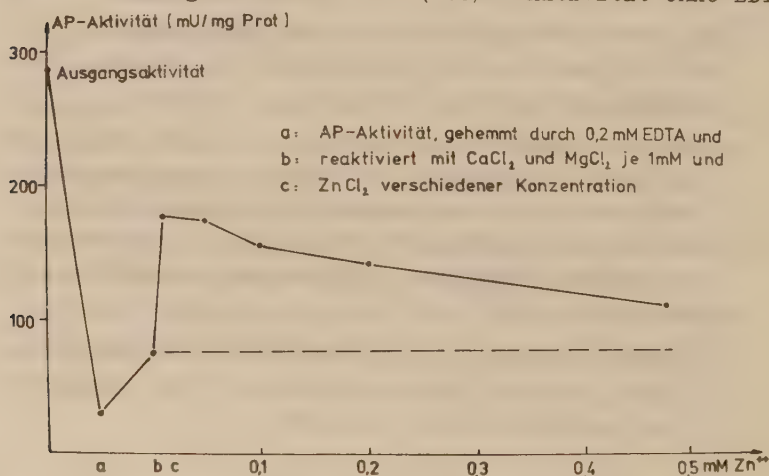


Abb. 18: Reaktivierung der AP nach Hemmung mit EDTA-Tris durch Magnesium, Calcium und Zink

e) Einfluß des nichtionischen Detergens Triton X 100 auf die Aktivität der AP und der Ca^{++} -ATPase

Die Enzymfraktion wird 10 min bei 37°C in verschiedenen konzentrierten Lösungen des nichtionischen Detergens Triton X 100 vorinkubiert und durchläuft anschließend den jeweiligen Test. Die Enzyme werden dadurch aus ihren Lipoproteidverbindungen herausgelöst.

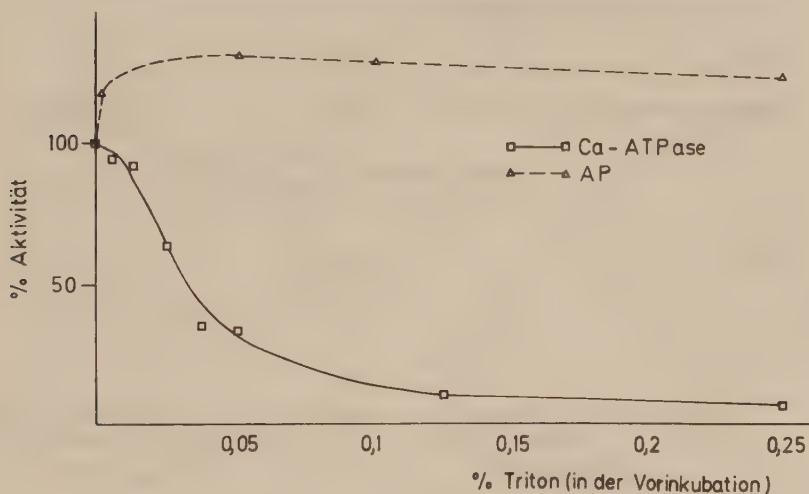


Abb. 19: Effekt von Triton X 100 auf die Aktivität der AP und der Ca^{++} -ATPase

Ergebnis: Während die Ca^{++} -ATPase bereits bei 0,15% Triton X 100 nur noch ca. 10% der Ausgangsaktivität ohne Triton erreicht, zeigt sich bei der AP ein leicht stimulierender Effekt bis zur Konzentration von ca. 0,05% Triton in der Vorinkubation. Bei höheren Tritonkonzentrationen sinkt die AP-Aktivität wieder langsam auf den Ausgangswert.

f) Einfluß des SH-Gruppenblockers p-CMB auf die Aktivität der AP und der Ca^{++} -ATPase

Die Enzymfraktionen werden 10 min bei 37°C in verschieden konzentrierten Lösungen des SH-Gruppen-Blockers p-CMB vorinkubiert und durchlaufen anschließend den jeweiligen Test. Im Falle einer Hemmung wurde der Versuch einer Reaktivierung mit Cystein unternommen.

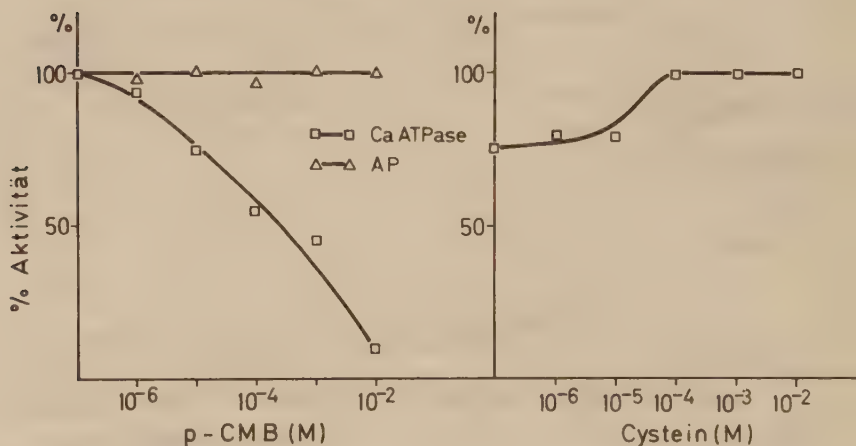


Abb.20: Hemmung der AP und der Ca^{++} -ATPase durch p-CMB, Reaktivierung der mit 10^{-5} M p-CMB gehemmten Ca^{++} -ATPase mit L-Cystein.

Ergebnis: Im Gegensatz zur AP wird die Ca^{++} -ATPase durch p-CMB gehemmt. Eine fast vollständige Hemmung der Ca^{++} -ATPase wird bei 10^{-2} M p-CMB erreicht. Die auf ca. 75% gehemmte Ca^{++} -ATPase kann durch L-Cystein voll reaktiviert werden.

g) Hemmung der AP durch das Tetramisolanalog R 8231

α) Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration

Bei gleichbleibender Molarität des p-NPP tritt die halbmaximale Hemmung der AP-Aktivität bei $4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$ R 8231 ein (siehe Abb.20). Eine vollständige Hemmung der AP-Aktivität findet sich ab 10^{-3} M R 8231.

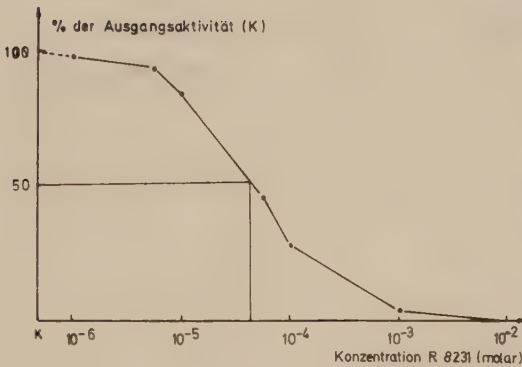


Abb.21: Hemmung der AP durch R 8231 bei konstant gehaltener p-NPP-Konzentration

Die halbmaximale Hemmung tritt ein bei $4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$ R 8231

β) Um den Hemmtyp der AP durch R 8231 zu charakterisieren, wurde die Substratabhängigkeit (0,1 - 2,5 mM p-NPP) mit und ohne R 8231 gemessen. Aus dem Auftrag nach Lineweaver-Burk ergaben sich folgende Werte:

	ohne R 8231	mit R 8231
k_m (mM)	0,66	0,32
v_{max} (mU/mg Prot.)	529	284

Ergebnis: R 8231 hemmt die kardiale AP somit unkompetitiv, die Ca^{++} -ATPase wird nicht gehemmt.

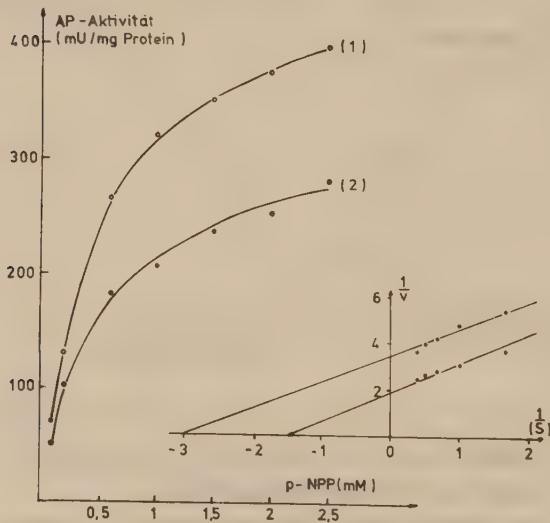


Abb.22: Substratabhängigkeit der AP ohne Hemmung (1) und nach Hemmung mit 0,05 mM R 8231 (2)

IV) Kompetitive Hemmung der AP durch ATP

1. Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration

Eine 50% Hemmung der AP-Aktivität tritt bei gleichbleibender p-NPP-Konzentration (15 mM) bei 3,4 mM ATP ein. Bei einer ATP-Konzentration von 5,0 mM ATP beträgt die AP-Aktivität noch ca. ein Viertel der Ausgangsaktivität

2. Zur Ermittlung der Hemmcharakteristik der AP durch ATP bestimmen wir die Aktivität der AP unter Veränderung der p-NPP-Konzentration (0,1 - 5,0 mM) mit (0,1; 0,5 mM) und ohne ATP (Abb.23 und 24).

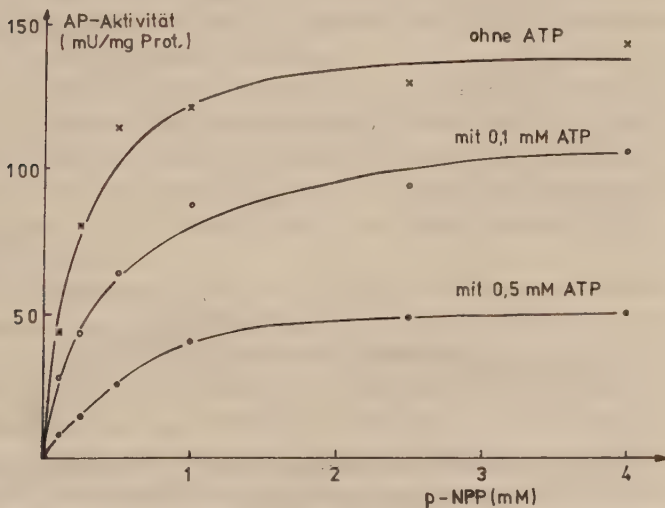


Abb.23: Substratabhängigkeit der AP ohne Hemmung und nach Hemmung mit 0,1 und 0,5 mM ATP

Aus der Lineweaver-Burk-Kurve (Abb.23) lassen sich folgende Größen ermitteln:

a) $k_m = 0,220$ (ohne ATP)

b) $k_m = 0,476$ (mit 0,1 mM ATP)

c) $k_m = 2,22$ (mit 0,5 mM ATP)

d) die maximale Reaktionsgeschwindigkeit beträgt für alle Substratabhängigkeiten:

$v_{max} = 250 \text{ mU/mg Prot.}$

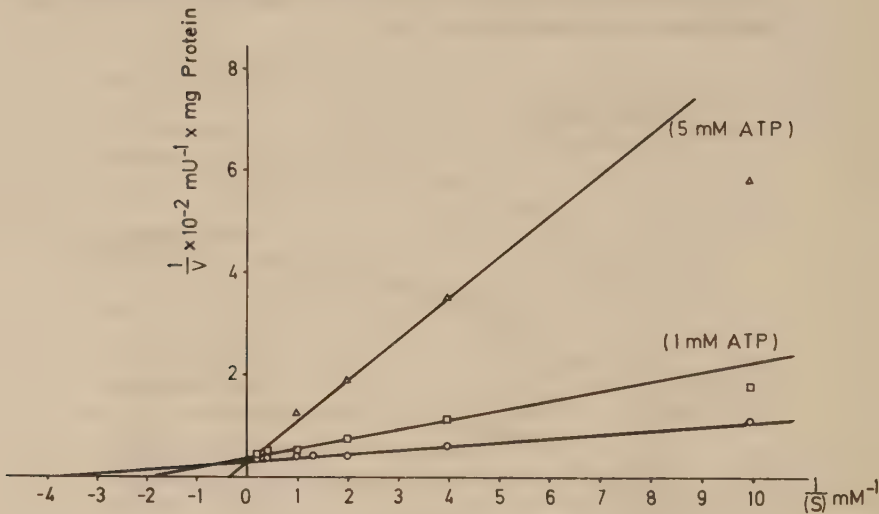


Abb.24: Kompetitive Hemmung der AP (Auftragung nach Lineweaver und Burk).

Ergebnis: ATP hemmt somit die AP kompetitiv. Die Tatsache, daß bereits 3,4 mM ATP eine halbmaximale Hemmung der AP (15 mM p-NPP) bewirkt, spricht für eine höhere Affinität des enzymatisch aktiven Zentrums zu ATP.

D) DISKUSSION

Zur Morphologie

Aus cytochemischen Untersuchungen von Borgers und Mitarbeitern (3) geht hervor, daß die AP und die ATPase am Rattenherzen unterschiedlich lokalisiert sind. Während sich die AP nur in den Endothelzellen der Arteriolen, den medialen glatten Gefäßmuskelzellen und den Myokardzellen selbst nachweisen läßt, wird ATPase-Aktivität gleichmäßig verteilt über die Koronargefäße und das Myokard gefunden. Dennoch zeigt sich, wie aus Abb.3 zu ersehen ist, ein ähnliches Verteilungsmuster der AP und der Ca^{++} -ATPase im Sarkolemm und FSR (Ausnahme: Mitochondrienfraktion) nach Zellorganellfraktionierung.

Obwohl die AP aus heterogenen Zellpopulationen stammt, zeigt die elektronenmikroskopische Wiedergabe der einzelnen Fraktionen weitgehend reine subzelluläre Strukturmerkmale. Die Zellfraktionierung erlaubt deshalb keinerlei Rückschlüsse auf den mehr vaskulären oder myokardialen Ursprung der AP.

Wegen der uniformen cytochemischen Verteilung der ATPase, wobei weder zwischen einer Mg^{++} -, Na^+K^+ - noch Ca^{++} -ATPase sicher unterschieden werden kann, kann diese Aktivität noch weniger zur Beurteilung der Herkunft der in der Mikrosomenfraktion gefundenen Strukturen herangezogen werden. Um näheren Aufschluß über die Reinheit der präparierten Zellorganellen zu erhalten, war es deshalb notwendig, nach Kriterien zu suchen, die über die morphologischen Strukturmerkmale hinausgehen.

Zu den Markerenzymen

Solche Kriterien liefern uns die Markerenzyme der Mitochondrienfraktion (SDH), des löslichen Überstands (MK) und des Sarkolemmes (Na^+K^+ -ATPase). Während Swynghedauw (32) mit der von ihm beschriebenen Präparationstechnik

in der Mitochondrienfraktion nur eine 1,5-fache Anreicherung der SDH-Aktivität gegenüber dem FSH beschreibt, erreichen wir eine 2,5-fache Anreicherung (Tabelle 1). Die MK-Aktivität liegt in der Mikrosomenfraktion um das 13-fache niedriger als im Überstand. Die Na^+K^+ -ATPase-Aktivität liegt im Sarkolemm doppelt so hoch wie in den Mikrosomen. Die Aktivität in der Mikrosomenfraktion ließe sich erklären aus einer Kontamination der Mikrosomen mit Sarkolemm-Fragmenten. Nach Katz (14) besitzt das FSR jedoch eine eigene Na^+K^+ -ATPase-Aktivität, die ohne Behandlung mit kaotropen Salzen überwiegend maskiert vorliegt. Die Na^+K^+ -ATPase erscheint deswegen als Markerenzym zur Differenzierung von Sarkolemm und FSR als ungeeignet.

Demgegenüber läßt sich die durch Magnesium aktivierbare p-NPPase des FSR (pH 7,4) gut zur Differenzierung gegenüber dem Sarkolemm heranziehen, da das Sarkolemm nur eine Magnesium-abhängig durch Kalium aktivierbare p-NPPase-Aktivität enthält.

Die Versuche über die Enzymverteilung erlauben deshalb nur den Schluß, daß es sich bei der präparierten Fraktion um eine Mikrosomenrohfraktion handelt. Am Hundeherzen konnte Katz (14) nach Ultrazentrifugation im Sucrose-Dichte-Gradienten unter Zusatz von Lithiumbromid eine weitgehende Abtrennung der Mitochondrienenzyme erreichen. Die Kontamination des FSR konnte dadurch gegenüber der Mikrosomenfraktion auf 20% verringert werden. Diese Präparationstechnik ist am Rattenherzen jedoch aus Materialgründen nicht durchführbar.

Zur Calcium-Aktivierungskinetik

Da Calcium-Ionen sowohl mit ATP als auch mit EDTA einen Komplex bilden, liegt die Konzentration von freiem Calcium unter unseren Versuchsbedingungen sehr viel niedriger als die Konzentration des zugesetzten Calcium, wie sich aus den Abb.7 und 8 ergibt. Eine freie Calcium-Ionenkonzentration von 5 μM reicht aus, um die ATP-Spaltung halbmaximal zu stimulieren. Sie liegt nur geringfügig über der Schwellenkonzentration für die Aktivierung des kontraktile Apperates (Aktomyosin-ATPase) (26).

Zur Definition " Ca^{++} -ATPase"

a) Zur Frage der Substratspezifität

Die Untersuchung der Substratspezifität der Ca^{++} -abhängigen ATPase zeigt, daß ATP sowohl durch andere Nukleosidtriphosphate als auch durch ADP ersetzbar ist (Abb.6). Ob es sich hierbei um eine direkte Phosphatfreisetzung aus ADP oder um eine Phosphatfreisetzung aus dem durch die MK-Reaktion zurückgewonnenen ATP handelt, kann ohne Eliminierung der MK-Aktivität nicht differenziert werden. Daraus kann gefolgert werden, daß es sich bei dieser Reaktion nicht um eine für ATP spezifische Reaktion handelt.

b) Zur Frage der Kationenspezifität

Aus Abb.9 geht hervor, daß die ATP-Hydrolyse auch durch andere divalente Kationen als Calcium stimuliert wird, wobei Magnesium die gleiche Aktivierung bewirkt wie Calcium. Die Definition " Ca^{++} -ATPase" sagt also nur aus, daß Calcium als Aktivator und ATP als Substrat eingesetzt wurden, nicht aber, daß diese Reaktion für Calcium und ATP spezifisch ist. Bezieht man nun das breite Spektrum der aktivierenden Kationen und unterschiedlichen Substrate mit in die Definition ein, so muß diese mikrosomale Enzymaktivität als Kationen-Nukleotid-Phosphatase bezeichnet werden.

Wie bereits in der Einleitung angedeutet, gibt es aus der Literatur Hinweise, die eine enge Beziehung einer solchen Enzymaktivität mit der AP wahrscheinlich machen, da nach Untersuchungen an gereinigter AP für dieses Enzym ebenfalls ein breites Substratspektrum kennzeichnend ist (9). Die Anreicherung sowohl von Ca^{++} -ATPase wie auch AP in Herzmikrosomen (Abb.3) legte den Verdacht auf eine solche Wechselbeziehung beider Enzyme auch am Herzmuskel nahe.

Zum Vergleich der beiden Enzyme

Substratabhängigkeit

Bowers (5) erzielte bei einer Substratkonzentration von 3 mM p-NPP eine maximale AP-Aktivität. Auch wir können mit 3 mM p-NPP 85% der errechneten Maximalaktivität (218 mU/mg Prot) erreichen; die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit lag bei 0,24 mM p-NPP.

Demgegenüber benötigt die Ca^{++} -ATPase 1,16 mM ATP, um halbmaximal stimuliert zu werden; bei 3 mM ATP erreichen wir 70% der errechneten Maximalaktivität (300 mU/mgProt). Somit erreicht die AP im Vergleich zur Ca^{++} -ATPase bei niedriger Substratkonzentration die Maximalgeschwindigkeit.

pH

Das pH-Optimum liegt nicht, wie bei der Na^+K^+ -ATPase, im physiologischen (pH 7,4), sondern im alkalischen pH-Bereich (pH 9,0). Es nähert sich somit stark dem pH-Optimum der AP (pH 10,0). Nach Bowers (5) ist der optimale pH-Bereich der AP zusätzlich vom Substratangebot und der Reaktionstemperatur abhängig. Danach verlagert sich das pH-Optimum der AP bei 37°C und optimalem Substratangebot um pH 0,5 in Richtung des neutralen pH. Außerdem hat der Temperaturangleich eine Aktivitätszunahme im pH-Optimum zur Folge, so daß sich der optimale pH-Bereich der AP stark dem der Ca^{++} -ATPase nähert.

Temperatur

Eine Inkubation bei 56°C führt innerhalb weniger Minuten zu einer starken Inaktivierung der beiden Phosphatasen, wobei sich die Ca^{++} -ATPase als etwas stabiler erweist (Abb. 15).

EDTA

EDTA hemmt die basalen Aktivitäten der Ca^{++} -ATPase und der AP (Abb. 16) bei einer Konzentration von 0,5 mM vollständig. Eine 50% Hemmung tritt bereits bei 0,02 mM EDTA ein. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch von Belle (1), Bowers (5) und Conyers (6). Während sich die Ca^{++} -ATPase jedoch durch Zugabe von 2 mM CaCl_2 bis zum 7-fachen der Ausgangsaktivität reaktivieren läßt, hat CaCl_2 auf die durch 0,2 mM EDTA auf 10% der basalen Aktivität gehemmte AP keinen nennenswerten reaktivierenden Einfluß. In Verbindung mit MgCl_2 ist eine Reaktivierung um 10% auf 20% der Ausgangsaktivität möglich. Conyers (6), Iqbal (13) und Haussler (10) schreiben dem Zinkion eine große Bedeutung für die APAktivität zu. Tatsächlich gelingt es auch, die AP mit 0,01 mM ZnCl_2 um weitere 40% auf 60% der Ausgangsaktivität zu steigern. Eine weitere Reaktivierung erscheint nicht möglich. Conyers nimmt an, daß die Inaktivierung der AP nicht nur auf dem Abfangen divalenter Kationen, wie im Fall der Ca^{++} -ATPase, beruht, sondern daß nach Abfangen der Kationen von der AP ein instabiles Enzymmolekül entsteht, das anschließend denaturiert. Dadurch wäre auch die nicht vollständige Reaktivierungsmöglichkeit der AP erklärbar.

Triton

Haussler (10) und Morton (23) erreichen durch Butanol-extraktion eine erhebliche Steigerung der AP-Aktivität. Haussler beschreibt außerdem eine AP-Zunahme nach Extraktion mit dem Detergens Triton X 100. Ähnliche Ergebnisse

ergeben unsere Versuche. Während die AP-Aktivität nach Vorinkubation in Triton X 100 um 30% gesteigert wird, erfährt die Ca^{++} -ATPase eine Hemmung auf 15% der Ausgangsaktivität (Abb.19). Dadurch erweist sich ein Teil der AP durch Lipide maskiert, während die Ca^{++} -ATPase von der Integrität der Lipoproteidmembranen abhängig ist.

p-CMB

Der SH-Gruppenblocker p-CMB hemmt ebenfalls die Ca^{++} -ATPaseaktivität, während die AP unbeeinflusst bleibt. Die durch 10^{-5} M pCMB auf 75% gehemmte Ca^{++} -ATPase ist durch L-Cystein reaktivierbar (Abb.20). Ähnliche Ergebnisse konnte van Belle (1) am Hundeorgan mit NEM gewinnen, während p-CMB die AP in Konzentrationen um 2 mM um 50% hemmte.

R 8231

Van Belle (1) beschrieb 1972 das Tetramisolderivat R 8231 als starken Hemmstoff der AP. Ein Jahr später ergaben cytochemische Untersuchungen von Borgers (4), daß diese Substanz die AP spezifisch hemmt. So ließen sich saure Phosphatase, ATPasen, Thiaminpyrophosphatase, Glucose-6-phosphatase und 5-Nukleotidase aus Rattengewebe durch R 8231 nicht beeinflussen. Die von uns untersuchte AP wird durch 10^{-3} M R 8231 vollständig gehemmt (Abb.21), nicht hingegen die Ca^{++} -ATPase. Eine Gegenüberstellung zweier Substratabhängigkeiten ohne und mit 0,05 mM R 8231 (Abb.22) ergibt den für diese Substanz beschriebenen nichtkompetitiven Hemmtyp.

Kationeneinfluß

Im Gegensatz zur Ca^{++} - ATPase hat Calcium auf die p-NPPase (pH 7,4) keinen Einfluß (Abb.10), jedoch kann mit Magnesium eine 3-4-fache Stimulierung der p-NPPase erreicht werden. Auf die so stimulierte p-NPPase übt Calcium einen hemmenden Einfluß aus.

Die von uns ermittelten Befunde weisen, sieht man einmal vom nahezu gleichen pH-Optimum sowie den unspezifischen Effekten der Hitze- und EDTA-Inaktivierung ab, darauf hin, daß es sich bei der AP und der Ca^{++} -ATPase um verschiedene Enzyme handelt. Dennoch erscheint es möglich, daß trotz verschiedener biochemischer Eigenschaften beide Enzyme die gleiche Funktion für den Ca^{++} -Transport haben. So fand Martin (22) eine Ca^{++} -ATPase-Stimulierung im Bürstensaum des Darms durch Vitamin D. Haussler (10) konnte eben diese Stimulierung neben der Ca^{++} -ATPase auch für die AP nachweisen. Nagode (25) beschrieb am Knochen einen Vitamin D bedingten Anstieg der AP und der Ca^{++} -ATPase. Berger (2) konnte beide Enzyme im Bürstensaum der Kaninchenniere um das 3-4-fache anreichern. Weiter konnten Hiwada (12) und Zech (35) eine transphosphorylierende und dephosphorylierende Eigenschaft der löslichen AP anhand der Phosphorylierung von Tris bzw. Diäthanolamin in hoher Konzentration nachweisen. Für die membrangebundene Ca^{++} -ATPase wird ebenfalls ein solcher Mechanismus angenommen.

Wir untersuchten deshalb, ob ATP auch die AP des Herzmuskels zu hemmen vermag. Tatsächlich hemmt ATP die AP kompetitiv, die k_m wird von 0,22 mM ohne ATP auf 2,2 mM durch 5 mM ATP erhöht (Abb. 23 und 24), die v_{max} bleibt unverändert. Damit ließ sich auch am Herzmuskel nachweisen, daß beide Substrate um das gleiche enzymatisch aktive Zentrum konkurrieren. Sowohl die gleiche Anreicherung der AP und Ca^{++} -ATPase im FSR wie auch der gemeinsame Angriffspunkt beider Substrate läßt vermuten, daß beide Aktivitäten auch am Herzmuskel nur verschiedene Eigenschaften des gleichen molekularen Systems darstellen. Trotz der im Vergleich zu anderen Organen sehr niedrigen Aktivität käme damit der AP im FSR des Herzmuskels eine wesentlich größere Bedeutung für den Ca^{++} -Transport zu, als bisher angenommen werden konnte.

E) Z U S A M M E N F A S S U N G

In einer mikrosomalen Vesikelfraktion aus Rattenherz-ventrikel finden wir eine um den Faktor 4 höhere spezifische Aktivität der AP als im Ventrikelhomogenat bzw. 10-fach höhere Aktivität als in Sarkolemm- bzw. Mitochondrienfraktionen. Auch die Aktivität der Ca^{++} - ATPase ist hier mit dem 2,5-fachen gegenüber dem Homogenat bzw. dem 8-fachen gegenüber dem Sarkolemm am höchsten. Hinsichtlich pH-Optimum, Hitze- und EDTA-Inaktivierbarkeit zeigen beide Aktivitäten ein ähnliches Verhalten. Unterschiedlich aber ist die Kationen-Reaktivierbarkeit nach EDTA-Hemmung, der Effekt des Detergens Triton X 100, und das Verhalten gegenüber SH-Gruppen-Blockierung. Trotz dieser unterschiedlichen Eigenschaften legt sowohl die Anreicherung der AP und Ca^{++} - ATPase in der gleichen Fraktion als auch die kompetitive Hemmung der AP durch ATP den Schluß nahe, daß diese unterschiedlichen Eigenschaften zu einem gemeinsamen Enzymkomplex im Membranverband gehören.

F) L I T E R A T U R

1. Van Belle, H.
Kinetics and inhibition of alkaline phosphatases from
canine tissues
Biochim.biophys.Acta, 289, 158-168(1972)
2. Berger, S.J. and Sacktor, B.
Isolation and biochemical characterization of brush
borders from rabbit kidney
J. Cell Biol., 47, 637-645(1970)
3. Borgers, M.; Schaper, J. and Schaper, W.
Adenosine-producing sites in the mammalian heart:
A cytochemical study
J.Mol.Cell.Card., 3, 287-296(1971)
4. Borgers, M.
The cytochemical application of new potent inhibitors
of alkaline phosphatases
J.Hist.Cyt., 21, 812-824(1973)
5. Bowers, G.W.(Jr.) and McComb, R.B.
A continuous spectrophotometric method for measuring
the activity of serum alkaline phosphatase
Clin.Chem., 12, 70-89(1966)
6. Conyers, R.A.J.; Birkett, D.J.; Neale, F.C.; Posen, S.
and Brudenell-Woods, J.
The action of EDTA on human alkaline phosphatases
Biochim.biophys.Acta, 139, 363-371(1967)
7. Dietze, G. and Hepp, K.D.
Calcium stimulated ATPase of cardiac sarcolemma
Biochem.biophys.Res.Comm., 44, 1041-1049(1971)

8. Dietze, G. und Hepp, K.D.
Effect of 3'5'-AMP on calcium activated ATPase in
rat heart sarcolemma
Biochem.biophys.Res.Comm., 46, 269-278(1972)
9. Fernley, H.N. and Walker, P.G.
Studies on alkaline phosphatase
Inhibition by phosphate derivatives and the substrate
specifity
Biochem.J., 104, 1011-1018(1967)
10. Haussler, M.R.; Nagode, L.A. and Rasmussen, H.
Induction of intestinal brush border alkaline phosphatase by Vitamin D and identity with Ca^{++} -ATPase
Nature, 228, 1199-1201(1970)
11. Hepp, K.D.; Edel, P.R. and Wieland, O.
Hormon Action on Liver Adenyl Cyclase Activity
Eur.J.Biochem., 17, 171-177(1970)
12. Hiwada, K. and Wachsmuth, E.D.
Catalytic properties of alkaline phosphatase from
pig kidney
Biochem.J.; 141, 283-291(1974)
13. Iqbal, M.
Effect of in vitro addition of zinc on alkaline
phosphatase activity in the zinc-deficient rat
Enzym.biol.clin., 11, 412-422(1969)
14. Katz, A.M.; Repke, D.J.; Upshaw, J.E. and Polascik, M.A.
Characterization of dog cardiac microsomes. Use of
zonal centrifugation to fractionate fragmented
sarcoplasmatic reticulum, $(\text{Na}^{+}, \text{K}^{+})$ activated ATPase
and mitochondrial fragments
Biochim.biophys.Acta, 205, 473-490(1970)

15. Katz, A.M. and Repke, D.E.
Calcium membrane interactions in the myocardium:
effects of Quabain, Epinephrine and 3'5'-cyclic
Adenosine-Monophosphat
Amer.J.Card., 31, 193-201(1973)
16. Kirchberger, M.A.; Tada, M.; Repke, D.J. and Katz, A.M.
Cyclic AMP-dependent protein kinase stimulation of
calcium uptake by canine cardiac microsomes
J.Mol.Cell.Card., 4, 673-680(1972)
17. Kirchberger, M.A.; Tada, M. and Katz, A.M.
Adenosine 3'-5'-monophosphate-dependent protein
kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its
relationship to calcium transport in cardiac
sarcoplasmatic reticulum
J.biol.Chem., 249, 6166-6173(1974)
18. Kumagai, H.; Ebashi, S. and Takeda, F.
Essential relaxing factor in muscle other than
myokinase and creatine phosphatase
Nature, 176, 166(1955)
19. Limas, C.J.; Notargiacomo, A.V. and Cohn, J.N.
Effect of cyclic 3'-5'-AMP on the Na^+K^+ -ATPase of
myocardial sarcolemma
Cardiovasc.Res., 7, 477-481(1973)
20. Luft, J.H.
Improvements in epoxy resin embedding methods
J.biophys.biochem.Cytol., 9, 409-414
21. MacLennan, D.H.
Resolution of the calcium transport system of
sarcoplasmatic reticulum
Canad.J.Biochem., 53, 251-261(1975)

22. Martin, D.L.; Melancon, M.J.; DeLuca, Jr. and DeLuca, H.F.
Vitamin D stimulated, calcium-dependent adenosine triphosphatase from brush borders of rat small intestine
Biochem.biophys.Res.Comm., 35, 819-823(1969)
23. Morton, R.K.
The purification of alkaline phosphatase of animal tissues
Biochem.J., 57, 595-603(1954)
24. Müller, E.
Die Bestimmung der anorganischen Phosphate in kleinsten Serummengen
Z.Kinderheilk., 57, 243-250(1936)
25. Nagode, L.A.; Haussler, M.R.; Boyce, D.W.; Pechet, M. and Rasmussen, H.
Vitamin D induced phosphatases in bone and intestine: Inhibitions by theophylline and diphosphonates
Fed.Proc., Abstract Nr. 694(1970)
26. Portzehl, H.; Caldwell, P.C. and Rüegg, J.C.
The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab *maia squinado* on the internal concentration of free calcium ions
Biochim.biophys.Acta, 79, 581-591(1964)
27. Post, R.L. and Sen, A.K.
Sodium and potassium-stimulated ATPase
Methods of Enzymology, Vol.X, p.762(1967)
Editors: Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.
Academic Press Inc. N.Y.
28. Repke, D.I. and Katz, A.M.
Stabilization of cardiac microsomal calcium uptake by hypertonic sucrose solutions
Biochim.biophys.Acta, 172, 348(1969)

29. Reynolds, E.S.
The use of lead citrate at high pH as an
electronopaque stain in electron microscopy
J.Cell Biol., 17, 208-212(1973)
30. Singer, T.P.; Bernath, P. und Lusty, C.J.
Bestimmung der SDH-Aktivität
in: Methoden enzymatischer Analyse, 2. Auflage
1573-1578(1970)
Herausgeber: Bergmeyer, H.U.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
31. Sottocasa, G.L.; Kuylenstierna, B.; Ernster, L. and
Bergstrand, A.
Separation and some enzymatic properties of the inner
and outer membranes of rat liver mitochondria
Methods of Enzymology, Vol.X, p.457(1967)
Editors: Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.
Academic Press Inc. N.Y.
32. Swynghedauw, B.; Bouveret, P. and Hatt, P.Y.
New fractionation scheme for preparation of heart
particles. ATPase activity of purified myofibrills
in chronic aortic insufficiency in the rabbit
J.Mol.Cell.Card., 5, 441-459(1973)
33. Tada, M.; Kirchberger, M.A.; Repke, D.J. and Katz, A.M.
The stimulation of calcium transport in cardiac
sarcoplasmatic reticulum by adenosine 3'-5'-mono-
phosphate-dependent protein kinase
J.biol.Chem., 249, 6174-6180(1974)

34. Walter, K. und Schütt, Ch.
Alkalische Phosphatase im Serum (fortlaufende Messung)
in: Methoden enzymatischer Analyse, 2. Auflage
823-826(1970)
Herausgeber: Bergmeyer, H.U.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
35. Zech, R.; Grote, M.; Zürcher, K. und Schlaeger, R.
Über die Phosphorylierung von Diäthanolamin durch
Alkalische Phosphatase
Z.klin.Chem., 11, 461-464(1973)

Danksagung

Für die ständige Beratung und Anleitung bei der Durchführung der Versuche und bei der Fertigstellung der Arbeit schulde ich Herrn Dr. med. H.-J. v. Funcke, München, größten Dank, ebenso Herrn Prof. Dr. H. Mehnert für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen danke ich Herrn Dr. med. Siess, München, für die Überlassung des Hemmstoffes R 8231 Herrn Borgers, Beerse, Belgien.

L e b e n s l a u f

Am 15. Januar 1950 wurde ich als erster Sohn des Kunst-
händlers Hermann Reiner und seiner Ehefrau Aenne, geb.
Baumann, in Babenhausen/Schwaben geboren.

1956 - 1960 besuchte ich die Volksschule Babenhausen,
1960 trat ich in das Simpert-Kraemer-Gymnasium in Krumbach
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig) ein und legte
dort am 20. Juni 1969 die Reifeprüfung ab.

An der Ludwig-Maximilians-Universität begann ich im
Wintersemester 1969/70 mein Medizinstudium:

Naturwissenschaftliche Vorprüfung im Sommersemester 1970

Ärztliche Vorprüfung im Wintersemester 1971/72

Die Ärztliche Prüfung legte ich im Juni 1975 ab.

Als Medizinalassistent hatte ich Gelegenheit, in einer
freien Praxis (Allgemeinmedizin), im Krankenhaus München-
Schwabing (Innere Medizin) und im städt. Krankenhaus
Memmingen (Chirurgie) zu arbeiten.

